



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

(21) **PI 0712223-3 A2**

(22) Data de Depósito: 01/06/2007
(43) Data da Publicação: 10/07/2012
(RPI 2166)



(51) *Int.Cl.:*
C07K 16/22
A61K 39/395
A61P 35/00

(54) **Título:** PROTEÍNAS DE LIGAÇÃO AO FATOR DE CRESCIMENTO DE HEPATÓCITO (HGF)

(30) **Prioridade Unionista:** 02/06/2006 US 60/810,714,
21/11/2006 US 60/860,461

(73) **Titular(es):** Aveo Pharmaceuticals, INC.

(72) **Inventor(es):** Bijan Etemad-Gilbertson, Christine Knuehl, Han May, Jenó Gyuris, Jie Lin, Lyne Breault, S. Kirk Wright, William M. Winston

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

(86) **Pedido Internacional:** PCT US2007012950 de
01/06/2007

(87) **Publicação Internacional:** WO 2007/143098de
13/12/2007

(57) **Resumo:** PROTEÍNAS DE LIGAÇÃO AO FATOR DE CRESCIMENTO DE HEPATÓCITO (HGF). A presente invenção refere-se a uma família de proteínas de ligação que se ligam e neutralizam a atividade do fator de crescimento de hepatócito (HGF), em particular, HGF humano. As proteínas de ligação podem ser usadas como agentes de diagnóstico ou terapêuticos. Com relação a sua atividade terapêutica, as proteínas de ligação podem ser usadas para tratar certas desordens responsivas a HGF, por exemplo, certos tumores responsivos a HGF.

Relatório Descritivo da Patente de Invenção para "**PROTEÍNAS DE LIGAÇÃO AO FATOR DE CRESCIMENTO DE HEPATÓCITO (HGF)**".

Pedidos Relacionados

5 Esse pedido reivindica o benefício e prioridade dos Pedidos Provisórios U.S. Nºs 60/810.714, depositado em 2 de junho de 2006 e 60/860.509, depositado em 21 de novembro de 2006, cujas descrições estão incorporadas aqui por referência.

Campo da Invenção

10 O campo da invenção é de biologia molecular, imunologia e oncologia. Mais particularmente, o campo é de proteínas ligantes baseadas em anticorpo que se ligam ao fator de crescimento do hepatócito humano (HGF).

Antecedentes

15 O Fator de Crescimento de Hepatócito (HGF), também conhecido como Fator de Dispersão (SF), é uma proteína heterodimérica multifuncional produzida predominantemente por células mesenquimais e é um efetor de células que expressam o receptor Met de tirosina quinase (Bottaro *et al.* (1991) SCIENCE 251: 802-804, Rubin *et al.* (1993) BIOCHIM. BIOPHYS. ACTA 1155: 357-371). O receptor Met humano também é conhecido como "c-Met".
20 HGF maduro contém duas cadeias de polipeptídeos, a cadeia α e a cadeia β . Estudos publicados sugerem que é a cadeia α que contém o domínio de ligação do receptor c-Met de HGF.

Quando se liga ao seu receptor cognato, HGF media várias atividades celulares. A via de sinalização HGF-Met desempenha um papel na
25 regeneração hepática, cicatrização de lesão, regeneração neural, angiogênese e malignidades. Veja, por exemplo, Cao *et al.* (2001) PROC. NATL. ACADEM. SCI. USA 98: 7443-7448, Burgess *et al.* (2006) CANCER RES. 66: 1721-1729, e Patentes U.S. Nºs 5.997.868 e 5.707.624. Pesquisadores têm desenvolvido vários moduladores de HGF, incluindo anticorpos para tratar vá-
30 rias desordens que envolvem atividade de HGF, por exemplo, certos cânceres responsivos a HGF. Veja, por exemplo, Publicação de Pedido Internacional Nº WO 2005/017107.

A estrutura básica comum para todos os anticorpos é mostrada esquematicamente na Figura 1. Anticorpos são proteínas multiméricas que contêm quatro cadeias de polipeptídeos. Duas das cadeias de polipeptídeo são chamadas de cadeias pesadas ou H e duas das cadeias de polipeptídeos são chamadas de cadeias leves ou L. As cadeias pesada e leve de imunoglobulina são conectadas por uma ligação de dissulfeto entre as cadeias. As cadeias pesadas de imunoglobulina são conectadas por várias pontes de dissulfeto entre as cadeias. Uma cadeia leve é composta de uma região variável (V_L na Figura 1) e uma região constante (C_L na Figura 1), enquanto que a cadeia pesada é composta de uma região variável (V_H na Figura 1) e pelo menos três regiões constantes (CH_1 , CH_2 e CH_3 na Figura 1). As regiões variáveis determinam a especificidade do anticorpo e as regiões constantes têm outras funções.

A informação estrutural e dos aminoácidos indica que cada região variável compreende três regiões hipervariáveis (também conhecidas como regiões de determinação de complementaridade ou CDRs) flanqueadas por quatro regiões de arcabouço relativamente conservadas ou FRs. As três CDRs, referidas como CDR_1 , CDR_2 , e CDR_3 , são responsáveis pela especificidade de ligação de anticorpos individuais. Quando os anticorpos são para serem usados como agentes de diagnóstico e terapêuticos, tipicamente é desejável criar anticorpos que tem a maior especificidade de ligação e afinidade com a molécula alvo. Acredita-se que diferenças nas regiões variáveis possam ter efeitos profundos sobre a especificidade e a afinidade do anticorpo.

Patente U.S. Nº 5.707.624 descreve o uso de anticorpos anti-HGF no tratamento do sarcoma de Kaposi. Similarmente, a Patente U.S. Nº 5.997.868 descreve o tratamento de um tumor pela administração de um anticorpo anti-HGF ao paciente a ser tratado a fim de bloquear a habilidade de HGF endógeno de promover angiogênese no tumor. Mais recentemente, pesquisadores propuseram que anticorpos que se ligam a cadeia β de HGF podem ter potencial como agentes terapêuticos em pacientes com tumores dependentes de HGF (Burgess (2006) *supra*).

Apesar disso, ainda há uma necessidade de moduladores adicionais de HGF que possam ser usados como agente terapêutico e diagnóstico.

Sumário da Invenção

5 A invenção é baseada, em parte, na descoberta de uma família de proteínas de ligação que se ligam especificamente a HGF, em particular, a HGF humano. As proteínas de ligação são baseadas em anticorpo à medida que elas contêm sítios de ligação de antígeno (isto é, HGF) baseados nas CDRs de uma família de anticorpos que se ligam especificamente a HGF. As proteínas de ligação podem ser usadas como agentes de diagnóstico e terapêuticos. Quando usadas como agente terapêutico, as proteínas de ligação são manipuladas (por exemplo, humanizadas) a fim de reduzir ou eliminar o risco de indução de resposta imune contra a proteína de ligação quando administrada ao receptor (por exemplo, um humano).

15 As proteínas de ligação neutralizam a atividade de HGF e, portanto, podem ser usadas como um agente terapêutico. Em certas modalidades, as proteínas de ligação impedem que HGF se ligue ao seu receptor cognato, c-Met, neutralizando dessa forma a atividade de HGF. Em outras modalidades, as proteínas de ligação se ligam a HGF e neutralizam sua atividade biológica, mas sem evitar que HGF se ligue ao receptor c-Met. Como HGF tem sido implicado no crescimento e proliferação de células cancerosas, as proteínas de ligação podem ser usadas para inibir a proliferação de células cancerosas. Além disso, quando administradas a um mamífero, as proteínas de ligação podem inibir ou reduzir o crescimento do tumor no mamífero.

25 Esses e outros aspectos e vantagens da invenção se tornarão claros após a consideração das seguintes figuras, descrição detalhada e reivindicações.

Descrição das Figuras

30 A invenção pode ser mais completamente compreendida com referência as seguintes figuras.

Figura 1 é uma representação esquemática de um anticorpo típico.

Figura 2 é um diagrama esquemático mostrando a seqüência de aminoácidos que define a região variável da cadeia pesada da imunoglobulina completa dos anticorpos indicados como 1A3, 1D3, 1F3, 2B8, 2F8, 3A12, 3B6 e 3D11. As seqüências de aminoácidos de cada anticorpo estão alinhadas uma contra outra e as regiões que definem o peptídeo de sinal, CDR₁, CDR₂, e CDR₃ estão identificadas em retângulos. As seqüências fora dos retângulos representam seqüências de FR.

Figura 3 é um diagrama esquemático que mostra as seqüências de CDR₁, CDR₂, e CDR₃ de cada uma das seqüências da região variável da cadeia pesada de imunoglobulina apresentadas na Figura 2.

Figura 4 é um diagrama esquemático que mostra a seqüência de aminoácidos que define a região variável da cadeia leve de imunoglobulina completa dos anticorpos 1A3, 1D3, 1F3, 2B8, 2F8, 3A12, 3B6, e 3D11. As seqüências de aminoácidos de cada anticorpo estão alinhadas uma contra outra e as regiões que definem o peptídeo de sinal, CDR₁, CDR₂, e CDR₃ estão identificadas em retângulos. As seqüências fora dos retângulos representam seqüências FR.

Figura 5 é um diagrama esquemático que mostra as seqüências de CDR₁, CDR₂, e CDR₃ de cada uma das seqüências da região variável da cadeia leve de imunoglobulina apresentadas na Figura 4.

Figura 6 é um gráfico que resume os resultados de um experimento para medir a atividade inibitória de tumor de anticorpos anti-HGF 1D3, 1F3, 1A3 e 2B8 em um modelo de xenoenxerto de U87MG. Losangos correspondem a PBS; triângulos correspondem ao anticorpo 1A3 anti-HGF; X corresponde ao anticorpo 1D3 anti-HGF; quadrados correspondem ao anticorpo 1F3 anti-HGF e círculos correspondem ao anticorpo 2B8 anti-HGF.

Figura 7 é um gráfico que resume os resultados de um experimento para medir a atividade inibitória de tumor de anticorpos anti-HGF 1D3, 1F3, 1A3 e 2B8 em um modelo de xenoenxerto de U118. Losangos correspondem a IgG; quadrados correspondem ao anticorpo 1F3 anti-HGF, triângulos ao anticorpo 1D3 anti-HGF; X corresponde ao anticorpo 1A3 anti-HGF; e círculos correspondem ao anticorpo 2B8 anti-HGF.

Figura 8 é uma tabela que resume os dados de ressonância de plásmon de superfície sobre a afinidade de ligação ao antígeno e a cinética de interação entre HGF humano e anticorpos 2B8 quimérico, quimérico/humanizado ou humanizado. A tabela lista os pares de cadeia leve Kappa e cadeia pesada de IgG1 testados. Aqueles anticorpos com desvios-padrão (STDEV) listados foram analisados em três experimentos independentes.

Figura 9 é um gráfico de barras que resume dados experimentais que indicam que Hu2B8 se liga a um epítopo mutuamente exclusivo para o anticorpo monoclonal 2B8 de murino. 2B8 humanizado ou quimérico foi capturado sobre um chip de Fc anti-humano. Então, HGF estava ligado a 2B8 quimérico ou humanizado. A habilidade de 2B8 de camundongo ou do anticorpo de controle (anticorpo policlonal anti-HGF de cabra) se ligar a HGF capturado foi medida. Ambos os anticorpos 2B8 humanizado e 2B8 quimérico impedem que 2B8 de murino se ligue a HGF. As barras brancas correspondem ao anticorpo 2B8 quimérico; as barras cinzas correspondem ao anticorpo Hu2B8 humanizado (região variável kappa Kv 1-39.1 e região variável de cadeia pesada Hv5-51.1); as barras pretas correspondem ao anticorpo Hu2B8 humanizado (região variável kappa Kv 3-15.1 e região variável de cadeia pesada Hv5-51.1).

20 Descrição Detalhada da Invenção

A invenção é baseada, em parte, na descoberta de uma família de proteínas de ligação que se ligam especificamente e neutralizam a atividade de HGF, em particular, HGF humano. As proteínas de ligação podem ser usadas em uma variedade de aplicações de diagnóstico e terapêuticas. As proteínas de ligação são baseadas nos sítios de ligação a antígeno de certos anticorpos monoclonais que foram selecionados por sua habilidade de se ligar e neutralizar a atividade de HGF. Em particular, as proteínas de ligação contêm seqüências de região variável de CDR de imunoglobulina que juntas definem um sítio de ligação para HGF.

30 Em vista da atividade neutralizante desses anticorpos, eles são particularmente úteis em modular o crescimento e/ou proliferação de células responsivas a HGF, por exemplo, células cancerosas. Quando usadas como

um agente terapêutico, as proteínas de ligação podem ser manipuladas a fim de minimizar ou eliminar o risco de indução de resposta imune contra a proteína de ligação quando administrada ao receptor. Além disso, dependendo da aplicação particular, considera-se que as proteínas de ligação podem ser

5 conjugadas com outras porções, por exemplo, marcadores detectáveis, por exemplo, radiomarcadores e moléculas efectoras, por exemplo, outra proteína e terapêuticos baseados em moléculas pequenas. Cada uma dessas características e aspectos da invenção é discutida em mais detalhes abaixo.

I – Proteínas de Ligação que se Ligam a HGF

10 Em um aspecto, a invenção fornece uma proteína de ligação isolada que se liga a HGF humano. A proteína de ligação compreende (i) uma região variável de cadeia leve de imunoglobulina que compreende a estrutura CDR_{L1}-CDR_{L2}-CDR_{L3} e (ii) uma região variável de cadeia pesada de imunoglobulina que compreende três regiões de determinação de complementaridade (CDRs), em que a região variável de cadeia leve de imunoglobulina e a região variável de cadeia pesada de imunoglobulina juntas definem um sítio de ligação único para a ligação de HGF humano. CDR_{L1} compreende a seqüência de aminoácidos X₁ X₂ Ser X₄ X₅ X₆ X₇ X₈ X₉ X₁₀ X₁₁ X₁₂ X₁₃ X₁₄ X₁₅, em que o aminoácido X₁ é Arg, Lys, ou Ser, X₂ é Ala ou Thr, X₄ é

15 Glu, Gln, ou Ser, X₅ é Asn, Asp, ou Ser, X₆ é Ile ou Val, X₇ é Asp, Lys, Ser, Val, ou Tyr, X₈ é uma ligação peptídica ou Tyr, X₉ é uma ligação peptídica ou Asp, X₁₀ é uma ligação peptídica ou Gly, X₁₁ é uma ligação peptídica ou Asn, X₁₂ é uma ligação peptídica, Ile, ou Ser, X₁₃ é Asn ou Tyr, X₁₄ é Ile, Leu, Met, ou Val, X₁₅ é Ala, Asn, His, ou Ser. CDR_{L2} compreende a seqüência de aminoácidos X₁₆ X₁₇ X₁₈ X₁₉ X₂₀ X₂₁ X₂₂, em que o aminoácido X₁₆ é Ala, Asp, Arg, Gly, ou Val, X₁₇ é Ala, Thr, ou Val, X₁₈ é Asn, Ser, ou Thr, X₁₉ é Arg, Asn, Lys, ou He, X₂₀ é Leu ou Arg, X₂₁ é Ala, Asn, Glu, Val, ou Pro, X₂₂ é Asp, Ser, ou Thr. CDR_{L3} compreende a seqüência de aminoácidos X₂₃ X₂₄ X₂₅ X₂₆ X₂₇ X₂₈ Pro X₃₀ Thr, em que o aminoácido X₂₃ é Leu, Gly, ou Gln, X₂₄

20 é His ou Gln, X₂₅ é Phe, Ser, Trp, ou Tyr, X₂₆ é Asp, Ile, Ser, Trp, ou Tyr, X₂₇ é Gly, Glu, Asn, ou Ser, X₂₈ é Asp, Asn, Phe, Thr, ou Tyr, X₃₀ é Leu, Phe, Pro, ou Tyr.

Em outro aspecto, a invenção fornece uma proteína de ligação isolada que se liga a HGF humano que compreende (i) uma região variável de cadeia pesada de imunoglobulina que compreende a estrutura CDR_{H1}-CDR_{H2}-CDR_{H3} e (ii) uma região variável de cadeia leve de imunoglobulina que compreende três regiões de determinação de complementaridade (CDRs), em que a região variável de cadeia pesada de imunoglobulina e a região variável de cadeia leve de imunoglobulina juntas definem um sítio de ligação único para a ligação de HGF humano. CDR_{H1} compreende a seqüência de aminoácidos X₁ Tyr X₃ X₄ X₅ em que o aminoácido X₁ é Asp, Asn, Ser, ou Thr, X₃ é Phe, Ser, Trp, ou Tyr, X₄ é Ile, Leu, ou Met, X₅ é Asn, His, ou Ser. CDR_{H2} compreende a seqüência de aminoácidos X₆ Ile X₈ X₉ X₁₀ X₁₁ Gly X₁₃ X₁₄ X₁₅ Tyr X₁₇ X₁₈ X₁₉ X₂₀ X₂₁ X₂₂, em que o aminoácido X₆ é Lys, Gln, Glu, Val, ou Tyr, X₈ é Asn, Gly, Ser, Trp, ou Tyr, X₉ é Ala, Pro ou Ser, X₁₀ é Gly ou Thr, X₁₁ é uma ligação peptídica, Asp, Asn, Gly, ou Ser, X₁₃ é Asp, Asn, His, ou Ser, X₁₄ é Ser ou Thr, X₁₅ é Asn ou Tyr, X₁₇ é Asn ou Pro, X₁₈ é Ala, Asp, Gly, Gln, Glu, Pro, ou Ser, X₁₉ é Asn, Lys, Met, ou Ser, X₂₀ é Leu, Phe ou Val, X₂₁ é Lys, Met, ou Gln, X₂₂ is Asp, Gly ou Ser. CDR_{H3} compreende a seqüência de aminoácidos X₂₃ X₂₄ X₂₅ X₂₆ X₂₇ X₂₈ X₂₉ X₃₀ X₃₁ X₃₂ X₃₃ X₃₄ Tyr, em que o aminoácido X₂₃ é Arg, Asn, Gln, ou Glu, X₂₄ é Gly, Leu, Arg, ou Tyr, X₂₅ é uma ligação peptídica, Asp, ou Gly, X₂₆ é uma ligação peptídica ou Gly, X₂₇ é uma ligação peptídica ou Tyr, X₂₈ é uma ligação peptídica, Leu, ou Tyr, X₂₉ é uma ligação peptídica, Gly, Leu, Arg, ou Val, X₃₀ é uma ligação peptídica, Asp, Gly, ou Glu, X₃₁ é uma ligação peptídica, Asn, Arg, Ser, ou Tyr, X₃₂ é uma ligação peptídica, Ala, Gly, Ile, ou Tyr, X₃₃ is Met ou Phe, X₃₄ é Ala ou Asp.

Compreende-se que a proteína de ligação pode compreender tanto a seqüências da cadeia leve de imunoglobulina quanto a cadeia pesada da imunoglobulina ou fragmentos destas, registrados acima. Além disso, compreende-se que a proteína de ligação pode ser um anticorpo intacto ou um fragmento de ligação ao antígeno deste ou um sítio de anticorpo biossintético.

Em certas modalidades, as seqüências de CDR da cadeia leve

de imunoglobulina e da cadeia pesada de imunoglobulina são interpostas com regiões de arcabouço (FR).

Em certas outras modalidades, as seqüências de CDR da cadeia leve de imunoglobulina e da cadeia pesada de imunoglobulina são interpostas entre regiões de arcabouço humanas ou humanizadas.

Em outro aspecto, a invenção fornece uma proteína de ligação isolada que se liga especificamente a HGF humano. A proteína de ligação compreende: (a) uma região variável da cadeia leve de imunoglobulina que compreende a estrutura CDR_{L1}-CDR_{L2}-CDR_{L3} e (b) uma região variável da cadeia pesada de imunoglobulina, em que a região variável da cadeia leve de imunoglobulina e a região variável da cadeia pesada de imunoglobulina juntas definem um sítio de ligação único para a ligação de HGF humano. A CDR_{L1} compreende uma seqüência selecionada do grupo que consiste em SEQ ID Nº: 8 (**1A3**), SEQ ID Nº: 18 (**2B8**), SEQ ID Nº: 28 (**2F8**), SEQ ID Nº: 38 (**3B6**), SEQ ID Nº: 48 (**3D11**), SEQ ID Nº: 58 (**1D3**), SEQ ID Nº: 68 (**1F3**), e SEQ ID Nº: 78 (**3A12**). A CDR_{L2} compreende uma seqüência selecionada do grupo que consiste em SEQ ID Nº: 9 (**1A3**), SEQ ID Nº: 19 (**2B8**), SEQ ID Nº: 29 (**2F8**), SEQ ID Nº: 39 (**3B6**), SEQ ID Nº: 49 (**3D11**), SEQ ID Nº: 59 (**1D3**), SEQ ID Nº: 69 (**1F3**), SEQ ID Nº: 79 (**3A12**) e SEQ ID Nº: 206 (**LR-MR2B8LC**). A CDR_{L3} compreende uma seqüência selecionada do grupo que consiste em SEQ ID Nº: 10 (**1A3**), SEQ ID Nº: 20 (**2B8**), SEQ ID Nº: 30 (**2F8**), SEQ ID Nº: 40 (**3B6**), SEQ ID Nº: 50 (**3D11**), SEQ ID Nº: 60 (**1D3**), SEQ ID Nº: 70 (**1F3**), e SEQ ID Nº: 80 (**3A12**). Ao longo do pedido e das reivindicações, as seqüências caracterizadas por uma SEQ ID Nº: particular, são acompanhadas em parênteses pelo anticorpo que foi a origem da seqüência particular. Como exemplo, SEQ ID Nº: 8 (**1A3**) indica que a SEQ ID Nº: 8 é baseada na seqüência presente no anticorpo 1A3.

Em uma modalidade, a proteína de ligação compreende uma região variável da cadeia leve de imunoglobulina que compreende uma CDR_{L1} que compreende a seqüência de SEQ ID Nº: 8 (**1A3**), uma CDR_{L2} que compreende a seqüência de SEQ ID Nº: 9 (**1A3**) e uma CDR_{L3} que compreende a seqüência de SEQ ID Nº: 10 (**1A3**).

Em outra modalidade, a proteína de ligação compreende uma região variável da cadeia leve de imunoglobulina que compreende uma C-DR_{L1} que compreende a seqüência de SEQ ID N^o: 18 (**2B8**), uma CDR_{L2} que compreende a seqüência de SEQ ID N^o: 19 (**2B8**) ou SEQ ID N^o: 206 (**LR-MR2B8LC**) e uma CDR_{L3} que compreende a seqüência de SEQ ID N^o: 20 (**2B8**).

Em outra modalidade, a proteína de ligação compreende uma região variável da cadeia leve de imunoglobulina que compreende uma C-DR_{L1} que compreende a seqüência de SEQ ID N^o: 28 (**2F8**), uma CDR_{L2} que compreende a seqüência de SEQ ID N^o: 29 (**2F8**) e uma CDR_{L3} que compreende a seqüência de SEQ ID N^o: 30 (**2F8**).

Em outra modalidade, a proteína de ligação compreende uma região variável da cadeia leve de imunoglobulina que compreende uma C-DR_{L1} que compreende a seqüência de SEQ ID N^o: 38 (**3B6**), uma CDR_{L2} que compreende a seqüência de SEQ ID N^o: 39 (**3B6**) e uma CDR_{L3} que compreende a seqüência de SEQ ID N^o: 40 (**3B6**).

Em outra modalidade, a proteína de ligação compreende uma região variável da cadeia leve de imunoglobulina que compreende uma C-DR_{L1} que compreende a seqüência de SEQ ID N^o: 48 (**3D11**), uma CDR_{L2} que compreende a seqüência de SEQ ID N^o: 49 (**3D11**) e uma CDR_{L3} que compreende a seqüência de SEQ ID N^o: 50 (**3D11**).

Em outra modalidade, a proteína de ligação compreende uma região variável da cadeia leve de imunoglobulina que compreende uma C-DR_{L1} que compreende a seqüência de SEQ ID N^o: 58 (**1D3**), uma CDR_{L2} que compreende a seqüência de SEQ ID N^o: 59 (**1D3**) e uma CDR_{L3} que compreende a seqüência de SEQ ID N^o: 60 (**1D3**).

Em outra modalidade, a proteína de ligação compreende uma região variável da cadeia leve de imunoglobulina que compreende uma C-DR_{L1} que compreende a seqüência de SEQ ID N^o: 68 (**1F3**), uma CDR_{L2} que compreende a seqüência de SEQ ID N^o: 69 (**1F3**) e uma CDR_{L3} que compreende a seqüência de SEQ ID N^o: 70 (**1F3**).

Em outra modalidade, a proteína de ligação compreende uma

região variável de cadeia leve de imunoglobulina que compreende uma CDR_{L1} que compreende a seqüência de SEQ ID Nº: 78 (**3A12**), uma CDR_{L2} que compreende a seqüência de SEQ ID Nº: 79 (**3A12**) e uma CDR_{L3} que compreende a seqüência de SEQ ID Nº: 80 (**3A12**).

5 Em cada uma das modalidades anteriores, as seqüências de CDR_{L1}, CDR_{L2}, e CDR_{L3} preferivelmente são interpostas entre FRs de imunoglobulina humanas ou humanizadas. É compreendido que a proteína de ligação pode ser um anticorpo intacto, um fragmento deste que se liga a antígeno ou um sítio de anticorpo biossintético.

10 Em outro aspecto, a invenção fornece uma proteína de ligação isolada que se liga a HGF humano. A proteína de ligação compreende: (a) uma região variável de cadeia pesada de imunoglobulina que compreende a estrutura CDR_{H1}-CDR_{H2}-CDR_{H3}e (b) uma região variável da cadeia leve de imunoglobulina, em que a região variável da cadeia pesada de imunoglobulina e a região variável da cadeia leve de imunoglobulina juntas definem um

15 sítio de ligação único para a ligação de HGF humano. A CDR_{H1} compreende uma seqüência selecionada do grupo que consiste em SEQ ID Nº: 5 (**1A3**), SEQ ID Nº: 15 (**2B8**), SEQ ID Nº: 25 (**2F8**), SEQ ID Nº: 35 (**3B6**), SEQ ID Nº: 45 (**3D11**), SEQ ID Nº: 55 (**1D3**), SEQ ID Nº: 65 (**1F3**), e SEQ ID Nº: 75

20 (**3A12**); a CDR_{H2} compreende uma seqüência selecionada do grupo que consiste em SEQ ID Nº: 6 (**1A3**), SEQ ID Nº: 16 (**2B8**), SEQ ID Nº: 26 (**2F8**), SEQ ID Nº: 36 (**3B6**), SEQ ID Nº: 46 (**3D11**), SEQ ID Nº: 56 (**1D3**), SEQ ID Nº: 66 (**1F3**), SEQ ID Nº: 76 (**3A12**), SEQ ID Nº: 202 (**Hu2B8 Hv1f.1**), SEQ ID Nº: 203 (**Hu2B8 Hv5a.1** ou **Hu2B8 Hv5-51.1**), SEQ ID Nº: 204

25 (**LR2B8HC**) e SEQ ID Nº: 205 (**LRMR2B8HC**); a CDR_{H3} compreende uma seqüência selecionada do grupo que consiste em SEQ ID Nº: 7 (**1A3**), SEQ ID Nº: 17 (**2B8**), SEQ ID Nº: 27 (**2F8**), SEQ ID Nº: 37 (**3B6**), SEQ ID Nº: 47 (**3D11**), SEQ ID Nº: 57 (**1D3**), SEQ ID Nº: 67 (**1F3**), e SEQ ID Nº: 77 (**3A12**).

 Em uma modalidade, a proteína de ligação compreende uma região variável da cadeia pesada de imunoglobulina que compreende: uma

30 CDR_{H1} que compreende a seqüência de SEQ ID Nº: 5 (**1A3**); uma CDR_{H2} que compreende a seqüência de SEQ ID Nº: 6 (**1A3**); e uma CDR_{H3} que

compreende a seqüência de SEQ ID Nº: 7 (**1A3**).

Em outra modalidade, a proteína de ligação compreende uma região variável da cadeia pesada de imunoglobulina que compreende: uma CDR_{H1} que compreende a seqüência de SEQ ID Nº:15 (**2B8**); uma CDR_{H2} que compreende a seqüência de SEQ ID Nº: 16 (**2B8**), SEQ ID Nº: 202 (**Hu2B8 Hv1f.1**), SEQ ID Nº: 203 (**Hu2B8 Hv5a.1** ou **Hu2B8 Hv5-51.1**), SEQ ID Nº: 204 (**LR2B8HC**) ou SEQ ID Nº: 205 (**LRMR2B8HC**); e uma CDR_{H3} que compreende a seqüência de SEQ ID Nº: 17 (**2B8**).

Em outra modalidade, a proteína de ligação compreende uma região variável da cadeia pesada de imunoglobulina que compreende: uma CDR_{H1} que compreende a seqüência de SEQ ID Nº:25 (**2F8**); uma CDR_{H2} que compreende a seqüência de SEQ ID Nº: 26 (**2B8**), e uma CDR_{H3} que compreende a seqüência de SEQ ID Nº: 27 (**2F8**).

Em outra modalidade, a proteína de ligação compreende uma região variável da cadeia pesada de imunoglobulina que compreende: uma CDR_{H1} que compreende a seqüência de SEQ ID Nº:35 (**3B6**); uma CDR_{H2} que compreende a seqüência de SEQ ID Nº: 36 (**3B6**), e uma CDR_{H3} que compreende a seqüência de SEQ ID Nº: 37 (**3B6**).

Em outra modalidade, a proteína de ligação compreende uma região variável da cadeia pesada de imunoglobulina que compreende: uma CDR_{H1} que compreende a seqüência de SEQ ID Nº:45 (**3D11**); uma CDR_{H2} que compreende a seqüência de SEQ ID Nº: 46 (**3D11**), e uma CDR_{H3} que compreende a seqüência de SEQ ID Nº: 47 (**3D11**).

Em outra modalidade, a proteína de ligação compreende uma região variável da cadeia pesada de imunoglobulina que compreende: uma CDR_{H1} que compreende a seqüência de SEQ ID Nº:55 (**1D3**); uma CDR_{H2} que compreende a seqüência de SEQ ID Nº: 56 (**1D3**), e uma CDR_{H3} que compreende a seqüência de SEQ ID Nº: 57 (**1D3**).

Em outra modalidade, a proteína de ligação compreende uma região variável da cadeia pesada de imunoglobulina que compreende: uma CDR_{H1} que compreende a seqüência de SEQ ID Nº:65 (**1F3**); uma CDR_{H2} que compreende a seqüência de SEQ ID Nº: 66 (**1F3**), e uma CDR_{H3} que

compreende a seqüência de SEQ ID Nº: 67 (**1F3**).

Em outra modalidade, a proteína de ligação compreende uma região variável da cadeia pesada de imunoglobulina que compreende: uma CDR_{H1} que compreende a seqüência de SEQ ID Nº:75 (**3A12**); uma CDR_{H2}
5 que compreende a seqüência de SEQ ID Nº: 76 (**3A12**), e uma CDR_{H3} que compreende a seqüência de SEQ ID Nº: 77 (**3A12**).

Em cada uma das modalidades anteriores, as seqüências de CDR_{H1}, CDR_{H2}, e CDR_{H3} preferivelmente são interpostas entre FRs de imunoglobulina humanas ou humanizadas. É compreendido que a proteína de
10 ligação pode ser um anticorpo intacto, um fragmento de ligação ao antígeno deste ou um sítio de anticorpo biossintético.

Em outro aspecto, a invenção fornece uma proteína de ligação isolada que se liga a HGF humano. A proteína de ligação compreende uma região variável de cadeia pesada selecionada do grupo que consiste nos
15 resíduos 20-141 de SEQ ID Nº: 2 (**1A3**), resíduos 20-137 de SEQ ID Nº: 12 (**2B8**), resíduos 20-137 de SEQ ID Nº: 22 (**2F8**), resíduos 20-139 de SEQ ID Nº: 32 (**3B6**), resíduos 20-132 de SEQ ID Nº: 42 (**3D11**), resíduos 20-141 de SEQ ID Nº: 52 (**1D3**), resíduos 20-141 de SEQ ID Nº: 62 (**1F3**), e resíduos 20-141 de SEQ ID Nº: 72 (**3A12**) e uma região variável da cadeia leve de
20 imunoglobulina selecionada do grupo que consiste nos resíduos 21-127 de SEQ ID Nº: 4 (**1A3**), resíduos 21-127 de SEQ ID Nº: 14 (**2B8**), resíduos 20-131 de SEQ ID Nº: 24 (**2F8**), resíduos 23-129 de SEQ ID Nº: 34 (**3B6**), resíduos 23-128 de SEQ ID Nº: 44 (**3D11**), resíduos 21-127 de SEQ ID Nº: 54 (**1D3**), resíduos 21-127 de SEQ ID Nº: 64 (**1F3**), e resíduos 21-127 de SEQ
25 ID Nº: 74 (**3A12**).

Em outra modalidade, a proteína de ligação compreende uma região variável de cadeia pesada de imunoglobulina que compreende a seqüência de aminoácidos dos resíduos 20-141 de SEQ ID Nº: 2 (**1A3**) e uma região variável da cadeia leve de imunoglobulina que compreende a seqüência de aminoácidos dos resíduos 21-127 de SEQ ID Nº: 4 (**1A3**).
30

Em uma modalidade, a proteína de ligação compreende uma região variável da cadeia pesada de imunoglobulina que compreende a se-

qüência de aminoácidos dos resíduos 20-137 de SEQ ID Nº: 12 (**2B8**) e uma região variável da cadeia leve de imunoglobulina que compreende a sequência de aminoácidos dos resíduos 21-127 de SEQ ID Nº: 4 (**2B8**).

5 Em outra modalidade, a proteína de ligação compreende uma região variável da cadeia pesada de imunoglobulina que compreende a sequência de aminoácidos dos resíduos 20-137 de SEQ ID Nº: 22 (**2F8**) e uma região variável de cadeia leve de imunoglobulina que compreende a sequência de aminoácidos dos resíduos 20-131 de SEQ ID Nº: 24 (**2F8**).

10 Em outra modalidade, a proteína de ligação compreende uma região variável da cadeia pesada de imunoglobulina que compreende a sequência de aminoácidos dos resíduos 20-139 de SEQ ID Nº: 32 (**3B6**) e uma região variável de cadeia leve de imunoglobulina que compreende a sequência de aminoácidos dos resíduos 23-129 de SEQ ID Nº: 34 (**3B6**).

15 Em outra modalidade, a proteína de ligação compreende uma região variável da cadeia pesada de imunoglobulina que compreende a sequência de aminoácidos dos resíduos 20-132 de SEQ ID Nº: 42 (**3D11**) e uma região variável da cadeia leve de imunoglobulina que compreende a sequência de aminoácidos dos resíduos 23-128 de SEQ ID Nº: 44 (**3D11**).

20 Em outra modalidade, a proteína de ligação compreende uma região variável da cadeia pesada de imunoglobulina que compreende a sequência de aminoácidos dos resíduos 20-141 de SEQ ID Nº: 52 (**1D3**) e uma região variável da cadeia leve de imunoglobulina que compreende a sequência de aminoácidos dos resíduos 21-127 de SEQ ID Nº: 54 (**1D3**).

25 Em outra modalidade, a proteína de ligação compreende uma região variável de cadeia pesada de imunoglobulina que compreende a sequência de aminoácidos dos resíduos 20-141 de SEQ ID Nº: 62 (**1F3**) e uma região variável da cadeia leve de imunoglobulina que compreende a sequência de aminoácidos dos resíduos 21-127 de SEQ ID Nº: 64 (**1F3**).

30 Em outra modalidade, a proteína de ligação compreende uma região variável da cadeia pesada de imunoglobulina que compreende a sequência de aminoácidos dos resíduos 20-141 de SEQ ID Nº: 72 (**3A12**) e uma região variável da cadeia leve de imunoglobulina que compreende a

seqüência de aminoácidos dos resíduos 21-127 de SEQ ID Nº: 74 (**3A12**).

Em qualquer uma das modalidades anteriores, a proteína de ligação pode ser um anticorpo intacto, um fragmento deste que se liga a antígeno ou um sítio de anticorpo biossintético.

5 Em outro aspecto, a invenção fornece uma proteína de ligação isolada que se liga a HGF humano. A proteína de ligação compreende (i) uma região variável da cadeia leve de imunoglobulina selecionada do grupo que consiste em SEQ ID Nº: 173 (**região variável da cadeia leve de Hu2B8 Kv1-39.1**), SEQ ID Nº: 179 (**região variável da cadeia leve de Hu2B8 Kv3-15.1**), SEQ ID Nº: 193 (**região variável da cadeia leve de LR2B8LC**), e
10 SEQ ID Nº: 199 (**região variável da cadeia leve de LRMR2B8LC**); e (ii) uma região variável da cadeia pesada de imunoglobulina que selecionada do grupo que consiste em SEQ ID Nº: 159 (**região variável da cadeia pesada de Hu2B8 Hv1f.1**), SEQ ID Nº: 165 (**região variável da cadeia pesada de Hu2B8 Hv5a.1**), SEQ ID Nº: 169 (**região variável da cadeia pesada de Hu2B8 Hv5-51.1**), SEQ ID Nº: 183 (**região variável da cadeia pesada de LR2B8HC**), e SEQ ID Nº: 189 (**região variável da cadeia pesada de LRMR2B8LC**). A proteína de ligação pode ser um anticorpo intacto, um fragmento de ligação ao antígeno deste ou um sítio de anticorpo biossintético.

20 Em outro aspecto, a invenção fornece uma proteína de ligação isolada que se liga a HGF humano. A proteína de ligação compreende (i) uma cadeia leve de imunoglobulina selecionada do grupo que consiste em SEQ ID Nº: 177 (**Hu2B8 Kv1-39.1 + constante kappa (alótipo Km(3) (alelo 2))**), SEQ ID Nº: 181 (**Hu2B8 Kv3-15.1 + constante Kappa (alótipo Km(3) (alelo 2))**), SEQ ID Nº: 197 (**LR2B8LC + constante Kappa (alótipo Km(3) (alelo 1))**), e SEQ ID Nº: 201 (**LRMR2B8LC + constante Kappa (alótipo Km(3) (alelo 1))**); e (ii) uma imunoglobulina da cadeia pesada selecionada do grupo que consiste em SEQ ID Nº: 163 (**Hu2B8 Hv1f.1 + constante de IgG1 (alótipo G1m(17,1))**), SEQ ID Nº: 167 (**Hu2B8 Hv5a.1 + constante de IgG1 (alótipo G1m(17,1))**), SEQ ID Nº: 171 (**Hu2B8 Hv5-51.1 + Constante de IgG1 (alótipo G1m(17,1))**), SEQ ID Nº: 187 (**LR2B8HC + constante de IgG1 (alótipo G1m(3) (alelo 1))**), e SEQ ID Nº: 191 (**LRMR2B8HC + cons-**

25

30

tante de IgG1 (alótipo G1m(3)) (alelo 1)). A proteína de ligação pode ser um anticorpo intacto, um fragmento de ligação ao antígeno deste ou um sítio de anticorpo biossintético.

Em outro aspecto, a invenção fornece uma proteína de ligação isolada que se liga a HGF humano reduzido. A proteína de ligação compreende (i) uma região variável da cadeia leve de imunoglobulina que compreende três CDRs e (ii) uma região variável da cadeia pesada de imunoglobulina que compreende três CDRs. As CDRs estão tipicamente interpostas entre FRs. As CDRs da cadeia leve de imunoglobulina e da cadeia pesada de imunoglobulina juntas definem um sítio de ligação que se liga a HGF humano reduzido, por exemplo, a cadeia α de HGF reduzido. HGF reduzido refere-se a HGF tratado com uma quantidade de agente redutor, por exemplo, ditioneitol (DTT), 2-mercaptoetanol ou glutathione suficiente para reduzir a ligação dissulfeto entre a cadeia α e a cadeia β . Concentrações exemplares incluem, por exemplo, DTT 100 mM e 2-mercaptoetanol 5%.

Em certas modalidades, a proteína de ligação compreende uma região variável de cadeia leve de imunoglobulina que compreende pelo menos uma CDR selecionada do grupo que consiste em CDR_{L1}, CDR_{L2} e CDR_{L3}. Opcionalmente, a proteína de ligação compreende duas CDRs, por exemplo, CDR_{L1} e CDR_{L2}, ou CDR_{L1} e CDR_{L3}, ou CDR_{L1} e CDR_{L3}. Opcionalmente, a proteína de ligação compreende todas as três CDRs, isto é, CDR_{L1}, CDR_{L2} e CDR_{L3}. CDR_{L1} compreende a seqüência de aminoácidos X₁ X₂ Ser X₄ X₅ X₆ X₇ X₈ X₉ X₁₀ X₁₁ X₁₂ X₁₃ X₁₄ X₁₅, em que o aminoácido X₁ é Arg ou Lys, X₂ é Ala ou Thr, X₄ é Glu ou Gln, X₅ é Asn, Ser, ou Asp, X₆ é Ile ou Val, X₇ é Tyr, Asp, ou Lys, X₈ é uma ligação peptídica ou Tyr, X₉ é uma ligação peptídica ou Asp, X₁₀ é uma ligação peptídica ou Gly, X₁₁ é uma ligação peptídica ou Asn, X₁₂ é uma ligação peptídica ou Ser, X₁₃ é Asn ou Tyr, X₁₄ é Ile ou Leu, X₁₅ é Ala, Asn, ou Ser. CDR_{L2} compreende a seqüência de aminoácidos X₁₆ X₁₇ X₁₈ X₁₉ Leu X₂₁ X₂₂, em que o aminoácido X₁₆ é Ala, Asp, Val, ou Arg, X₁₇ é Ala ou Val, X₁₈ é Asn, Ser, ou Thr, X₁₉ é Arg, Asn, ou He, X₂₁ é Ala, Glu, Val, ou Pro, X₂₂ é Asp ou Ser. CDR_{L3} compreende a seqüência de aminoácidos X₂₃ X₂₄ X₂₅ X₂₆ X₂₇ X₂₈ Pro X₃₀ Thr, em que o ami-

noácido X_{23} é Leu ou Gln, X_{24} é H ou Gln, X_{25} é Phe, Ser, ou Tyr, X_{26} é Asp, Ile, ou Trp, X_{27} é Gly ou Glu, X_{28} é Asp, Phe, ou Thr, X_{30} é Phe, Pro, ou Tyr.

Em outra modalidade, a proteína de ligação compreende uma região variável de cadeia leve de imunoglobulina que compreende pelo me-
 5 nos uma CDR selecionada do grupo que consiste em CDR_{H1} , CDR_{H2} , e CDR_{H3} . Opcionalmente, a proteína de ligação compreende duas CDRs, por exemplo, CDR_{H1} e CDR_{H2} , ou CDR_{H1} e CDR_{H3} , ou CDR_{H1} e CDR_{H3} . Opcionalmente, a proteína de ligação compreende todas as três CDRs, isto é, CDR_{H1} , CDR_{H2} e CDR_{H3} . CDR_{H1} compreende a seqüência de aminoácidos
 10 X_1 Tyr X_3 X_4 X_5 , em que o aminoácido X_1 é Asp, Asn, Ser, ou Thr, X_3 é Phe, Trp, ou Tyr, X_4 é Ile ou Met, X_5 é Asn, Hé, ou Ser. CDR_{H2} compreende a seqüência de aminoácidos X_6 Ile X_8 X_9 Gly X_{11} Gly X_{13} X_{14} X_{15} Tyr X_{17} X_{18} X_{19} X_{20} Lys X_{22} , em que o aminoácido X_6 é Lys, Gln, ou Tyr, X_8 é Gly, Ser, ou Tyr, X_9 é Pro ou Ser, X_{11} é Asp, Gly, ou Ser, X_{13} é Asp ou Ser, X_{14} é Ser ou
 15 Thr, X_{15} é Asn ou Tyr, X_{17} é Asn ou Pro, X_{18} é Ala, Asp, Gly, ou Glu, X_{19} é Asn, Met, ou Ser, X_{20} é Phe ou Val, X_{22} é Asp ou Gly. CDR_{H3} compreende a seqüência de aminoácidos X_{23} X_{24} X_{25} X_{26} X_{27} X_{28} X_{29} X_{30} X_{31} X_{32} X_{33} Asp Tyr, em que o aminoácido X_{23} é Arg ou Gln, X_{24} é Gly ou Leu, X_{25} é Asp, Gly, ou uma ligação peptídica, X_{26} é Gly ou uma ligação peptídica, X_{27} é uma li-
 20 gação peptídica ou Tyr, X_{28} é Leu, uma ligação peptídica ou Tyr, X_{29} é a Gly, Arg ou Leu, X_{30} é Asp, Gly ou Glu, X_{31} é a Tyr, Arg ou Asn, X_{32} é Ala, Gly ou Tyr, X_{33} é Met ou Phe.

Compreende-se que a proteína de ligação pode compreender ambas as seqüências de cadeia leve de imunoglobulina e cadeia pesada de
 25 imunoglobulina ou fragmentos dessas, registrados acima. Além disso, é compreendido que a proteína de ligação pode ser um anticorpo intacto ou um fragmento deste que se liga a antígeno ou um sítio de anticorpo biossintético.

Em certas modalidades, a proteína de ligação compreende uma
 30 região variável da cadeia leve de imunoglobulina que compreende (i) uma CDR_{L1} que tem uma seqüência selecionada do grupo que consiste em SEQ ID Nº: 8 (**1A3**), SEQ ID Nº: 28 (**2F8**), SEQ ID Nº: 38 (**3B6**), SEQ ID Nº: 58

(1D3), e SEQ ID Nº: 68 (1F3), (ii) uma CDR_{L2} que tem uma seqüência selecionada do grupo que consiste em SEQ ID Nº: 9 (1A3), SEQ ID Nº: 29 (2F8), SEQ ID Nº: 39 (3B6), SEQ ID Nº: 59 (1D3), e SEQ ID Nº: 69 (1F3), e (iii) uma CDR_{L3} que tem uma seqüência selecionada do grupo que consiste em
5 SEQ ID Nº: 10 (1A3), SEQ ID Nº: 30 (2F8), SEQ ID Nº: 40 (3B6), SEQ ID Nº: 60 (1D3), e SEQ ID Nº: 70 (1F3). As seqüências de CDR podem ser interpostas entre FRs humanas ou humanizadas.

Em outras modalidades, a proteína de ligação compreende uma região variável da cadeia leve de imunoglobulina que compreende uma seqüência de aminoácidos selecionada do grupo que consiste nos resíduos 21-127 de SEQ ID Nº: 4 (1A3), resíduos 20-131 de SEQ ID Nº: 24 (2F8), resíduos 23-129 de SEQ ID Nº: 34 (3B6), resíduos 21-127 de SEQ ID Nº: 54 (1D3), e resíduos 21-127 de SEQ ID Nº: 64 (1F3).

Em certas outras modalidades, a proteína de ligação compreende uma região variável de cadeia pesada de imunoglobulina que compreende (i) uma CDR_{H1} que tem uma seqüência selecionada do grupo que consiste em SEQ ID Nº: 5 (1A3), SEQ ID Nº: 25 (2F8), SEQ ID Nº: 35 (3B6), SEQ ID Nº: 55 (1D3), e SEQ ID Nº: 65 (1F3), (ii) uma CDR_{H2} que tem uma seqüência selecionada do grupo que consiste em SEQ ID Nº: 6 (1A3), SEQ ID Nº: 26 (2F8), SEQ ID Nº: 36 (3B6), SEQ ID Nº: 56 (1D3), e SEQ ID Nº: 66 (1F3), e (iii) uma CDR_{H3} que tem uma seqüência selecionada do grupo que consiste em SEQ ID Nº: 7 (1A3), SEQ ID Nº: 27 (2F8), SEQ ID Nº: 37 (3B6), SEQ ID Nº: 57 (1D3), e SEQ ID Nº: 67 (1F3). As seqüências de CDR podem ser interpostas entre FRs humanas ou humanizadas.

Em outra modalidade, a região variável da cadeia pesada de imunoglobulina compreende uma seqüência de aminoácidos selecionada do grupo que consiste nos resíduos 20-141 de SEQ ID Nº: 2 (1A3), resíduos 20-137 de SEQ ID Nº: 22 (2F8), resíduos 20-139 de SEQ ID Nº: 32 (3B6), resíduos 20-141 de SEQ ID Nº: 52 (1D3), e resíduos 20-141 de SEQ ID Nº: 62 (1F3).

Em outro aspecto, a invenção fornece uma proteína de ligação isolada que se liga a HGF humano e compreende uma região variável de

cadeia leve de imunoglobulina e uma região variável de cadeia pesada de imunoglobulina. A proteína de ligação isolada compete pela ligação a HGF com pelo menos um anticorpo de referência selecionado do grupo que consiste em (i) um anticorpo que tem uma região variável de cadeia leve de imunoglobulina com resíduos 20-131 de SEQ ID N°: 24 (**2F8**) e uma região variável de cadeia pesada de imunoglobulina com resíduos 20-137 de SEQ ID N°: 22 (**2F8**), (ii) um anticorpo que tem uma região variável de cadeia leve de imunoglobulina com resíduos 23-129 de SEQ ID N°: 34 (**3B6**), e uma região variável de cadeia pesada de imunoglobulina com resíduos 20-139 de SEQ ID N°: 32 (**3B6**) e (iii) um anticorpo que tem uma região variável de cadeia leve de imunoglobulina com resíduos 23-128 de SEQ ID N°: 44 (**3D11**) e uma região variável de cadeia pesada de imunoglobulina com resíduos 20-132 de SEQ ID N°: 42 (**3D11**). Sob certas circunstâncias, a proteína de ligação se liga ao mesmo epítopo de HGF como um dos anticorpos de referência.

É compreendido que cada uma das proteínas de ligação discutidas acima pode ser um anticorpo intacto, por exemplo, um anticorpo monoclonal. Alternativamente, a proteína de ligação pode ser um fragmento de um anticorpo que se liga a antígeno ou pode ser um sítio de ligação de anticorpo biossintético. Fragmentos de anticorpo incluem fragmentos Fab, Fab', (Fab')₂ ou Fv. Técnicas para fazer tais fragmentos de anticorpo são conhecidas por aqueles versados na técnica. Vários sítios de ligação de anticorpo biossintético são conhecidos na técnica, por exemplo, moléculas de Fv único ou sFv, descritas, por exemplo, na Patente U.S. N° 5.476.786. Outros sítios de ligação de anticorpo biossintético incluem proteínas de ligação biespecíficas ou bi-funcionais que são anticorpos ou fragmentos de anticorpo que se ligam a pelo menos dois antígenos diferentes. Por exemplo, proteínas de ligação biespecíficas podem se ligar a HGF, por exemplo, HGF humano e outro antígeno de interesse. Métodos para fazer anticorpos bi-específicos são conhecidos na técnica e incluem, por exemplo, a fusão de hibridomas ou ligação de fragmentos Fab'. Veja, por exemplo, Songsivilai *et al.* (1990) CLIN. EXP. IMMUNOL. 79: 315-325; Kostelny *et al.* (1992) J. IMMUNOL. 148: 1547-1553.

As proteínas de ligação da invenção podem se ligar a hHGF que contém uma substituição de cisteína por arginina na posição 561 ou uma substituição de glicina por glutamato na posição 555.

Em outro aspecto, a invenção fornece uma proteína de ligação isolada que se liga a HGF humano com uma k_d de $4,0 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$ ou menor, $3,0 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$ ou menor, ou $2,0 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$ ou menor. As proteínas de ligação isoladas podem se ligar a HGF humano com k_d de $5,0 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$ a $0,5 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$, ou de $4,0 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$ a $1,0 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$, ou de $3,0 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$ a $1,5 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$. Em outro aspecto, a invenção fornece uma proteína de ligação isolada que se liga a HGF humano com K_d de 100 pM ou menor, ou 20 pM ou menor, ou 10 pM ou menor ou 5 pM ou menor. As proteínas de ligação isoladas podem se ligar a HGF humano com K_D de 100 pM a 5 pM, ou de 20 pM a 5 pM, ou de 15 pM a 10 pM, ou de 20 pM a 10 pM, ou de 15 pM a 5 pM. A menos que especificado de outra maneira, valores de K_D são determinados pelos métodos e sob as condições descritas no Exemplo 6.

Em outro aspecto, a invenção fornece uma proteína de ligação isolada que se liga a HGF humano, em que o anticorpo se liga a HGF humano com K_D menor a 37°C do que a 25°C. A proteína de ligação opcionalmente se liga a HGF humano com K_D menor do que 5 pM a 37°C.

Em outros aspectos e modalidades, as proteínas de ligação podem inibir a ligação de hHGF a c-Met. Por exemplo, as proteínas de ligação podem ter uma IC_{50} (concentração a 50% da inibição máxima) de pelo menos cerca de 4,0, 4,5, 5,0, 5,5, 6,0, 6,5, e 7,0 nM quando testadas usando o protocolo descrito no Exemplo 7(a). Em certas outras modalidades, as proteínas de ligação podem neutralizar a incorporação de BrdU mediada por HGF em células 4 MBr-5 (ATCC, N° de Catálogo CCL208) usando o método descrito no Exemplo 7(b).

As proteínas de ligação podem ter uma IC_{50} de 50 nM ou menor, preferivelmente 45, 40, 35, 30, 25, 20, 15, 10, 5, 1, 0.5 nM ou menor, quando ensaiadas usando o protocolo descrito no Exemplo 7(b). Em certas outras modalidades, as proteínas de ligação podem ser usadas para inibir a fosforilação de c-Met estimulada por HGF em células PC-3 (ATCC, Manassus, VA

Nº de Catálogo. CRL-1435) usando o ensaio descrito no Exemplo 9.

II – Produção de Proteínas de Ligação

Proteínas de ligação da invenção podem ser produzidas de várias maneiras usando abordagens conhecidas na técnica. Por exemplo, moléculas de DNA que codificam regiões variáveis de cadeia leve e regiões variáveis de cadeia pesada podem ser sintetizadas quimicamente, usando um sintetizador comercial e a informação de seqüência fornecida nesse. Tais moléculas sintéticas de DNA podem ser ligadas a outras seqüências de nucleotídeo apropriadas, incluindo, por exemplo, seqüências que codificam região constante e seqüências de controle da expressão, para produzir construtos de expressão de gene convencionais que codificam as proteínas de ligação desejadas. A produção de construtos de genes definidos está dentro da técnica de rotina. Alternativamente, as seqüências fornecidas aqui podem ser clonadas de hibridomas por técnicas de hibridização convencionais ou técnicas de PCR, usando sondas de ácido nucléico sintético cujas seqüências são baseadas na informação de seqüência fornecida aqui ou na informação de seqüência da técnica anterior com relação a genes que codificam as cadeias pesadas e leves de anticorpos de murino em células de hibridoma. A produção e uso de tais sondas está dentro da técnica ordinária.

Os ácidos nucléicos que codificam as proteínas de ligação desejadas podem ser introduzidos (ligados) em vetores de expressão, que podem ser introduzidos em uma célula hospedeira através de técnicas usuais de transfecção ou de transformação conhecidas na técnica. Células hospedeiras exemplares incluem, por exemplo, células de *E. coli*, células de ovário de hamster chinês (CHO), células de rim de filhote de hamster (BHK), células de rim de macaco (COS), células de carcinoma hepatocelular humano (por exemplo, Hep G2) e células de mieloma que não produzem proteína imunoglobulina de outra maneira. Células hospedeiras transfectadas podem ser cultivadas sob condições que permitem as células hospedeiras expressar os genes de interesse, por exemplo, os genes que codificam as regiões variáveis de cadeia leve e pesada de imunoglobulina. Os produtos de expressão resultantes podem ser coletados usando técnicas conhecidas.

As condições de expressão e purificação particulares variarão dependendo de qual sistema de expressão é empregado. Por exemplo, se o gene for expresso em *E. coli*, ele é clonado primeiro em um vetor de expressão. Isso é obtido pelo posicionamento do gene manipulado à jusante do promotor bacteriano adequado, por exemplo, TrP ou Tac, e uma seqüência de sinal, por exemplo, uma seqüência que codifica um fragmento B da proteína A (FB). A proteína de fusão expressa resultante se acumula tipicamente em corpos refrativos ou de inclusão no citoplasma das células e podem ser coletadas após a ruptura das células por prensa francesa ou sonicação. Os corpos refrativos são então solubilizados e as proteínas expressas re-noveladas e clivadas por métodos já estabelecidos para muitas outras proteínas recombinantes.

Se o gene manipulado for expresso em células hospedeiras eucarióticas, por exemplo, células de mieloma ou células CHO, ele é inserido primeiro em um vetor de expressão que contem um promotor eucariótico adequado, um sinal de secreção, intensificadores de imunoglobulina e vários íntrons. Esse vetor de expressão pode conter opcionalmente seqüências que codificam toda ou uma parte de uma região constante, possibilitando que uma cadeia pesada ou leve inteira ou uma parte seja expressa. O construto de gene pode ser transfectado em células de mieloma ou células CHO usando protocolos de transfecção estabelecidos. Tais células transfectadas podem expressar fragmentos de V_L ou V_H , heterodímeros de V_L - V_H , polipeptídeos de cadeia simples de V_H - V_L ou V_L - V_H , cadeias pesadas ou leves completas de imunoglobulina ou porções desses, cada um dos quais podendo ser acoplados a um domínio de proteína que tem outra função (por exemplo, citotoxicidade).

III – Modificações das Proteínas de Ligação

É compreendido que as proteínas de ligação podem ser modificadas para otimizar o desempenho dependendo do uso pretendido das proteínas de ligação. Por exemplo, a proteína de ligação está sendo usada como um agente terapêutico, a proteína de ligação pode ser modificada para reduzir sua imunogenicidade no receptor pretendido. Alternativamente ou,

adicionalmente, a proteína de ligação pode ser fundida ou acoplada a outra proteína ou peptídeo, por exemplo, um fator de crescimento, citocina ou citotoxina. Tais modificações podem ser obtidas usando técnicas de manipulação de gene de rotina conhecidas na técnica.

5 Várias técnicas para reduzir a antigenicidade de anticorpos ou fragmentos de anticorpo são conhecidas na técnica. Essas técnicas podem ser usadas para reduzir ou eliminar a antigenicidade das proteínas de ligação da invenção. Por exemplo, quando as proteínas de ligação são para ser administradas a um humano, as proteínas de ligação são preferivelmente
10 manipuladas para reduzir sua antigenicidade em humanos. Esse processo é geralmente referido como humanização. Preferivelmente, as proteínas de ligação humanizadas têm a mesma ou substancialmente a mesma afinidade pelo antígeno que a proteína de ligação não humanizada original da qual ela é derivada.

15 Em uma abordagem de humanização bem conhecida, proteínas quiméricas são criadas nas quais as regiões constantes de imunoglobulina de anticorpos de uma espécie, por exemplo, camundongo, são substituídas por regiões constantes de imunoglobulina de uma segunda espécie diferente, por exemplo, um humano. Nesse exemplo, o anticorpo resultante é uma
20 quimera de camundongo-humano, onde as seqüências da região constante humana, em princípio, são menos imunogênicas do que as seqüências de murino correspondentes. Esse tipo de manipulação de anticorpo é descrito, por exemplo, em Morrison, *et al.* (1984) PROC. NAT. ACAD. SCI. 81: 6851-6855, Neuberger *et al.* (1984) NATURE 312: 604-608; Patente U.S. Nos.
25 6.893.625 (Robinson); 5.500.362 (Robinson); e 4.816.567 (Cabilly).

 Em outra abordagem, conhecida como enxerto de CDR, as CDRs das regiões variáveis de cadeia leve e pesada de um anticorpo de interesse são enxertadas em regiões de arcabouço (FRs) de outra espécie. Por exemplo, CDRs de murino podem ser enxertadas em seqüências de FR hu-
30 manas. Em algumas modalidades, as CDRs das regiões variáveis de cadeia leve e pesada de um anticorpo anti-HGF são enxertadas em FRs humanas ou FRs humanas de consenso. A fim de criar FRs humanas de consenso,

FRs de várias seqüências de aminoácidos de cadeia pesada ou cadeia leve humanas são alinhadas para identificar a seqüência de aminoácidos de consenso. O enxerto de CDR está descrito, por exemplo, em Patente U.S. Nos. 7.022.500 (Queen); 6.982.321 (Winter); 6.180.370 (Queen); 6.054.297 (Carter); 5.693.762 (Queen); 5.859.205 (Adair); 5.693.761 (Queen); 5.565.332 (Hoogenboom); 5.585.089 (Queen); 5.530.101 (Queen); Jones *et al.* (1986) NATURE 321: 522-525; Riechmann *et al.* (1988) NATURE 332: 323-327; Verhoeyen *et al.* (1988) SCIENCE 239: 1534-1536; e Winter (1998) FEBS LETT 430: 92-94.

10 Em uma abordagem chamada “super-humanização”, anticorpos nos quais a imunogenicidade humana está reduzida ou eliminada são criados por uma forma alternativa de enxerto. Na super-humanização, seqüências de FR são escolhidas de um grupo de genes de linhagem germinativa humana com base na similaridade estrutural das CDRs humanas com aque-
15 las do anticorpo de camundongo a ser humanizado. Essa abordagem é descrita, por exemplo, na Patente U.S. Nº 6.881.557 (Foote) e em Tan *et al.* (2002) J. IMMUNOL 169:1119-1125.

Outras abordagens para reduzir a imunogenicidade incluem técnicas que são conhecidas como “transformação”, “hiperquimerização” ou
20 “recapeamento/revestimento” para produzir anticorpos humanizados. Veja, por exemplo, Vaswami *et al.* (1998) ANNALS OF ALLERGY, ASTHMA, & IMMUNOL. 81: 105; Roguska *et al.* (1996) PROT. ENGINEER 9: 895-904; e Patente U.S. Nº 6.072.035 (Hardman). Na abordagem de recapeamento/revestimento, os
25 resíduos de aminoácidos de superfície acessível no anticorpo de murino são substituídos por resíduos de aminoácidos mais freqüentemente encontrados nas mesmas posições em um anticorpo humano. Esse tipo de revestimento de anticorpo está descrito, por exemplo, na Patente U.S. Nº 5.639.641 (Pedersen).

Uma abordagem exemplar para conversão de um anticorpo de
30 camundongo em uma forma adequada para uso médico em humanos é conhecida como tecnologia ACTIVMAB™ (Vaccinex, Inc., Rochester, NY), que envolve um vetor baseado no vírus da vacínia para expressar anticorpos em

células de mamífero. Altos níveis de diversidade combinatória das cadeias pesadas e leves de imunoglobulina são ditos serem produzidos. Veja, por exemplo, Patente U.S. N^{os} 6.706.477 (Zauderer); 6.800.442 (Zauderer); e 6.872.518 (Zauderer).

5 Outra abordagem exemplar para conversão de um anticorpo de camundongo em uma forma adequada para uso em humanos é a tecnologia praticada comercialmente por KaloBios Pharmaceuticals, Inc. (Palo Alto, CA). Essa tecnologia envolve o uso de uma biblioteca “acceptora” de propriedade humana para produzir uma biblioteca “focalizada no epítopo” para se-
10 leção de anticorpo.

 Outra abordagem exemplar para modificação de um anticorpo de camundongo em uma forma adequada para uso médico em humanos é a tecnologia HUMAN ENGINEERING[®] (HE[®]), que é praticada comercialmente por XOMA (US) LLC. Veja, por exemplo, Pedido de Publicação Internacional
15 N^o WO 93/11794 e Patente U.S. N^{os} 5.766.886; 5.770.196; 5.821.123; e 5.869.619.

 Qualquer abordagem adequada, incluindo qualquer uma das abordagens acima, pode ser utilizada para reduzir ou eliminar a imunogenicidade humana de uma proteína de ligação de interesse.

20 Além disso, é possível criar anticorpos totalmente humanos em camundongos. Nessa abordagem, anticorpos humanos são preparados usando um camundongo transgênico no qual os genes que produzem anticorpo de camundongo foram substituídos por uma porção substancial de genes que produzem anticorpo humano. Tais camundongos produzem imunoglobulina humana ao invés de moléculas de imunoglobulina de murino.
25 Veja, por exemplo, WO 98/24893 (Jacobovitz et al.) e Mendez *et al.* (1997) NATURE GENETICS 15: 146-156. Anticorpos monoclonais anti-HGF totalmente humanos podem ser produzidos usando a seguinte abordagem. Camundongos transgênicos que contêm genes de imunoglobulina humana são imuni-
30 zados com o antígeno de interesse, por exemplo, HGF. Células linfáticas dos camundongos são então obtidas dos camundongos, que são então fundidas com uma linhagem celular de tipo mielóide para preparar linhagens celulares

de hibridoma imortalizado. As linhagens celulares de hibridoma são rastreadas e selecionadas para identificar linhagens celulares de hibridoma que produzem anticorpos específicos para HGF.

5 Proteínas de ligação da invenção podem ser conjugadas com outras moléculas, dependendo do uso pretendido. Por exemplo, se a proteína de ligação for usada como um terapêutico, então a proteína de ligação pode ser conjugada com outro agente, por exemplo, uma molécula efetora que modula ou, promove a terapia de outra forma. À medida que o efector é um agente baseado em uma não proteína, por exemplo, um fármaco de molécula
10 pequena, um radiomarcador ou toxina, então o agente pode ser quimicamente acoplado usando químicas de acoplamento *in vitro* padronizadas. Se, por outro lado, a molécula efetora é uma proteína ou peptídeo, por exemplo, uma enzima, receptor, toxina, fator de crescimento, citocina ou outro imunomodulador, então a proteína de ligação pode ser quimicamente acoplada ao efector
15 usando químicas de acoplamento *in vitro* ou podem ser acopladas ao efector como uma proteína de fusão. Proteínas de fusão podem ser construídas e expressas usando técnicas similares àquelas discutidas na seção II.

IV – Uso de Proteínas de Ligação

20 As proteínas de ligação descritas aqui podem ser usadas como um agente de diagnóstico ou um agente terapêutico.

(1) Aplicações Terapêuticas

25 Como as proteínas de ligação da invenção neutralizam a atividade de HGF, elas podem ser usadas em várias aplicações terapêuticas. Por exemplo, certas proteínas de ligação da invenção são úteis na prevenção ou tratamento de doenças ou desordens hiperproliferativas, por exemplo, várias formas de câncer.

30 As proteínas de ligação podem ser usadas para inibir ou reduzir a proliferação de células tumorais. Em tal abordagem, as células tumorais são expostas a uma quantidade terapeuticamente eficaz da proteína de ligação a fim de inibir ou reduzir a proliferação da célula tumoral. Em certas modalidades, as proteínas de ligação inibem a proliferação de célula tumoral em pelo menos 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95% ou 100%.

Em certas modalidades, a proteína de ligação é usada para inibir ou reduzir a proliferação de uma célula de tumor, na qual a proteína de ligação reduz a habilidade de hHGF de se ligar a c-Met. Em outras modalidades, a proteína de ligação é usada para inibir ou reduzir a proliferação de uma célula de tumor mesmo quando a proteína de ligação se liga a hHGF mas não inibe substancialmente a ligação de hHGF a c-Met, como demonstrado pelo anticorpo 3B6 nas Tabelas 5 e 6.

Além disso, a proteína de ligação pode ser usada para inibir ou reduzir o crescimento ou desenvolvimento do tumor em um mamífero. Em tal método, uma quantidade eficaz de proteína de ligação é administrada ao mamífero a fim de inibir ou reduzir o crescimento do tumor em um mamífero. Conseqüentemente, as proteínas de ligação podem ser usadas para tratar tumores, por exemplo, em um mamífero. O método compreende administrar uma quantidade terapeuticamente eficaz da proteína de ligação. A proteína de ligação pode ser administrada sozinha ou em combinação com outra molécula farmacologicamente ativa a fim de tratar o tumor.

Considera-se que as proteínas de ligação da invenção podem ser usadas no tratamento de uma variedade de desordens responsivas a HGF, incluindo, por exemplo, células tumorais responsivas a HGF no câncer de pulmão, câncer de mama, câncer de colo, câncer de próstata, câncer ovariano, câncer de cabeça e pescoço, câncer ovariano, mieloma múltiplo, câncer de fígado, câncer gástrico, câncer de esôfago, câncer de rim, câncer de nasofaringe, câncer pancreático, mesotelioma, melanoma e glioblastoma.

Conforme usado aqui "tratar", "tratando" e "tratamento" referem-se ao tratamento de um estado de doença em um mamífero, particularmente em um humano, e incluem: (a) impedir que o estado de doença ocorra em um mamífero, em particular quando tal mamífero está predisposto ao estado de doença, mas ainda não foi diagnosticado como o tendo; (b) inibir o estado de doença, isto é, parar seu desenvolvimento; e/ou (c) aliviar o estado de doença, isto é, causar a regressão do estado de doença.

Geralmente, uma quantidade terapeuticamente eficaz do componente ativo estará na faixa entre cerca de 0,1 mg/kg a cerca de 100

mg/kg, opcionalmente de cerca de 1 mg/kg a cerca de 100 mg/kg, opcionalmente de cerca de 1 mg/kg a cerca de 10 mg/kg. A quantidade administrada dependerá de variáveis tais como o tipo e extensão da doença ou indicação a ser tratada, do estado de saúde do paciente em particular, da eficácia biológica relativa da proteína de ligação liberada, da formulação da proteína de ligação, da presença e dos tipos de excipientes na formulação e da via de administração. A dosagem inicial administrada pode ser aumentada além do nível superior a fim de se obter rapidamente o nível sanguíneo ou nível tecidual desejados ou a dosagem inicial pode ser menor do que o ótimo e a dosagem diária pode ser progressivamente aumentada durante o curso do tratamento dependendo da situação particular. A dosagem humana pode ser otimizada, por exemplo, em um estudo de intensificação de dosagem convencional de Fase I planejado para correr entre 0,5 mg/kg a 20 mg/kg. A frequência de dosagem pode variar, dependendo de fatores tais como a via de administração, quantidade dosada e a condição da doença a ser tratada. Frequências de dosagem exemplares são uma vez por dia, uma vez por semana e uma vez a cada duas semanas. A via de administração preferida é parenteral, por exemplo, infusão intravenosa. A formulação de fármacos baseados em anticorpos monoclonais está dentro da técnica comum. Em algumas modalidades da invenção, a proteína de ligação, por exemplo, um anticorpo monoclonal, é liofilizada e reconstituída em salina tamponada no momento da administração.

As proteínas de ligação podem ser administradas tanto sozinhas quanto em combinação com outros ingredientes farmacêuticamente ativos. Os outros ingredientes ativos, por exemplo, imunomoduladores, podem ser administrados junto com a proteína de ligação ou podem ser administrados antes ou depois da proteína de ligação.

Formulações contendo as proteínas de ligação para uso terapêutico, incluem tipicamente as proteínas de ligação combinadas com um veículo farmacêuticamente aceitável. Conforme usado aqui, "veículo farmacêuticamente aceitável" significa tampões, veículos e excipientes que são, dentro do escopo do julgamento clínico, adequados para uso em contato

com tecidos de seres humanos e animais sem toxicidade excessiva, irritação, resposta alérgica ou outro problema ou complicação, correspondente a uma proporção benefício/risco razoável. O(s) veículo(s) deve(m) ser “aceitável(eis)” no sentido de serem compatíveis com outros ingredientes das formulações e não deletérios para o receptor. Veículos farmaceuticamente aceitáveis, nesse aspecto, pretendem incluir qualquer um e todos os tampões, solventes, meios de dispersão, revestimentos, agentes isotônicos e prolongadores da absorção e semelhantes, compatíveis com administração farmacêutica. O uso de tais meios e agentes para substâncias farmaceuticamente ativas é conhecido na técnica.

As formulações podem ser convenientemente apresentadas em uma forma de dosagem unitária e podem ser preparadas por qualquer método adequado, incluindo quaisquer métodos bem conhecidos na técnica da farmácia. Uma composição farmacêutica da invenção deve ser formulada para ser compatível com sua via de administração pretendida. Exemplos de vias de administração incluem administração parenteral ou administração não parenteral, por exemplo, intravenosa, intradérmica, inalação, transdérmica (tópica), transmucosa e administração retal. Soluções úteis para administração oral ou parenteral podem ser preparadas por qualquer um dos métodos bem conhecidos na técnica farmacêutica, descritos, por exemplo, em *Remington's Pharmaceutical Sciences*, 18ª d. (Mack Publishing Company, 1990).

Formulações adequadas para administração oral podem estar na forma de: unidades individuais tais como injeções, cápsulas, cápsulas gelatinosas, sachês, comprimidos, pastilhas ou drágeas, cada uma contendo uma quantidade predeterminada da proteína de ligação; uma composição em pó ou granulada; uma solução ou uma suspensão em um líquido aquoso ou um líquido não aquoso; ou uma emulsão de óleo em água ou uma emulsão de água em óleo.

Formulações adequadas para administração parenteral incluem, por exemplo, os seguintes componentes: um diluente estéril tal como água para injeção, solução salina, óleos fixos, polietileno glicóis, glicerina, propileno glicol ou outros solventes sintéticos; agentes antibacterianos tais como

álcool benzílico ou metil parabenos; antioxidantes tais como ácido ascórbico ou bissulfeto de sódio; agentes quelantes tais como ácido etilenodiaminotetracético; tampões tais como acetatos, citratos ou fosfatos e agentes para o ajuste da tonicidade tais como ácido hidrocloreto ou hidróxido de sódio. A
5 preparação parenteral pode ser acondicionada em ampolas, seringas descartáveis ou frascos de doses múltiplas feitos de vidro ou plástico.

Em geral, composições adequadas para uso injetável incluem soluções aquosas (quando solúveis em água) ou dispersões e pós para
10 preparação extemporânea de soluções injetáveis estéreis ou dispersão. Para administração intravenosa, veículos adequados incluem salina fisiológica, água bacteriostática, Cremophor ELTM (BASF, Parsippany, NJ) ou salina tamponada com fosfato (PBS). Ela deve ser estável sob as condições de produção e armazenamento e deve ser preservada contra a ação contami-
15 nante de microrganismos tais como bactérias e fungos. O veículo pode ser um solvente ou um meio de dispersão que contem, por exemplo, água, etanol, poliol (por exemplo, glicerol, propileno glicol e polietileno glicol líquido) e misturas adequadas desses.

As formulações farmacêuticas preferivelmente são estéreis. A esterilização pode ser obtida, por exemplo, por filtração através de membra-
20 nas de filtração estéreis. Onde as composições são liofilizadas, a esterilização usando esse método pode ser conduzida antes ou após a liofilização e reconstituição. Uma vez que a composição farmacêutica tenha sido formulada, ela pode ser armazenada, por exemplo, em frascos como uma solução, suspensão, gel, emulsão, sólido ou como um pó desidratado ou liofilizado.

25 (2) Aplicações Diagnósticas

Sempre que as proteínas de ligação forem usadas com propósitos de diagnóstico, tanto *in vitro* quanto *in vivo*, as proteínas de ligação são
30 marcadas tanto diretamente quanto indiretamente com uma porção detectável. A porção detectável pode ser qualquer porção que é capaz de produzir, tanto diretamente quanto indiretamente, um sinal detectável. Por exemplo, a porção detectável pode ser um radioisótopo, tal como ³Hidrogênio (³H), ¹⁴Carbono (¹⁴C), ³²Fósforo (³²P), ³⁵Enxofre (³⁵S), ou ¹²⁵Iodo (¹²⁵I); um com-

posto fluorescente ou quimioluminescente, tal como isotiocianato de fluoresceína, rodamina ou luciferina; uma enzima, tal como fosfatase alcalina, beta-galactosidase ou peroxidase de rábano silvestre; uma sonda paramagnética, tal como um marcador de spin; ou uma partícula colorida, por exemplo, uma partícula de látex ou ouro. É compreendido que a proteína de ligação pode ser conjugada com a porção detectável usando várias abordagens conhecidas na técnica, por exemplo, como descrito em Hunter *et al.* (1962) NATURE 144: 945; David *et al.* (1974) BIOCHEMISTRY 13: 1014; Pain *et al.* (1981) J. IMMUNOL. METH. 40: 219; and Nygren (1982) J. HISTOCHEM. AND CYTOCHEM. 30: 407. Os marcadores podem ser detectados, por exemplo, visualmente ou com a ajuda de um espectrofotômetro ou outro detector.

As proteínas de ligação podem ser empregadas em uma ampla faixa de técnicas de imunoensaio disponíveis na técnica. Imunoensaios exemplares incluem, por exemplo, imunoensaios sanduíche, imunoensaios competitivos e procedimentos imuno-histoquímicos.

Em um imunoensaio sanduíche, dois anticorpos que se ligam a um analito ou antígeno de interesse são usados, por exemplo, um imobilizado sobre um suporte sólido e um livre em solução e marcado com uma porção detectável. Quando uma amostra que contém o antígeno é introduzida nesse sistema, o antígeno se liga ao anticorpo imobilizado e ao anticorpo marcado, para formar um "sanduíche" de complexo imune sobre a superfície do suporte. A proteína complexada é detectada pela lavagem dos componentes não ligados da amostra e do excesso de anticorpo marcado e pela medida de anticorpo marcado complexado à proteína sobre a superfície do suporte. Alternativamente, o anticorpo livre em solução pode ser detectado por um terceiro anticorpo marcado com uma porção detectável que se liga ao anticorpo livre. Uma revisão detalhada do planejamento de ensaio imunológico, teoria e protocolos podem ser encontrados em vários textos, incluindo Butt, ed., (1984) PRACTICAL IMMUNOLOGY, Marcel Dekker, New York; Harlow *et al.* eds. (1988) ANTIBODIES, A LABORATORY APPROACH, Cold Spring Harbor Laboratory; and Diamandis *et al.*, eds. (1996) IMMUNOASSAY, Academic Press, Boston.

É considerado que as proteínas de ligação marcadas são úteis

como agentes de imagem *in vivo*, através do que as proteínas de ligação podem direccionar os agentes de imagem para os tecidos particulares de interesse do receptor. Uma porção remotamente detectável preferida para imagem *in vivo* inclui o átomo radioativo Tecnécio^{99m} (^{99m}Tc), um emissor gama com uma meia-vida de cerca de seis horas. Porções não radioativas também úteis em imagem *in vivo* incluem marcadores de spin de nitróxido assim como lantanídeo e íons de metal de transição, todos os quais induzem atenuação de próton *in situ*. Além de imunotomografia, as porções radioativas complexadas podem ser usadas em protocolos padronizados de radioimunoterapia para destruir as células-alvo. Nucleotídeos preferidos para radioimunoterapia em altas doses incluem os átomos radioativos ⁹⁰Ítrio (⁹⁰Yt), ¹³¹Iodo (¹³¹I) e ¹¹¹Índio (¹¹¹In). A proteína de ligação pode ser marcada com ¹³¹I, ¹¹¹In e ^{99m}Tc usando técnicas de acoplamento conhecidas nas técnicas de imagem. Similarmente, procedimentos para preparar e administrar o agente de imagem assim como capturar e processar imagens são bem conhecidas na técnica de imagem e, portanto não são discutidos em detalhes nesse. Similarmente, métodos para realizar imunoterapias baseadas em anticorpo são bem conhecidas na técnica. Veja, por exemplo, Patente U.S. Nº 5.543.254.

Ao longo de toda a descrição, onde as composições são descritas como tendo, incluindo ou compreendendo componentes específicos, é contemplado que as composições também consistem essencialmente, ou consistem nos componentes listados. Similarmente, onde os processos são descritos como tendo, incluindo ou compreendendo etapas específicas do processo, os processos também consistem essencialmente ou consistem nas etapas de processamento listadas. Exceto onde indicado de outra maneira, a ordem das etapas ou ordem de realização de certas ações são irrelevantes com a condição de que a invenção permaneça operativa. Além disso, a menos que observado de outra maneira, duas ou mais etapas ou ações podem ser conduzidas simultaneamente.

30 Exemplos

Os seguintes exemplos discutem a produção e caracterização e vários anticorpos monoclonais anti-hHGF.

Exemplo 1 – Produção de Anticorpos Monoclonais Anti-hHGF

Este Exemplo descreve a produção de vários anticorpos monoclonais anti-hHGF.

As imunizações, fusões e rastreamentos primários foram conduzidos em MBS Inc. (Portland, ME), após o protocolo de Múltiplos Locais de Imunização Repetitiva (Repetitive Immunization Multiple Sites (RIMMS)). Cinco camundongos AJ e cinco camundongos Balb/c foram imunizados com HGF humano recombinante (R&D Systems, Minneapolis, MN; Nº de Catálogo 294-HGN-025). Dois camundongos com soros apresentando as maiores atividades anti-HGF por Ensaio Imunoabsorvente Ligado a Enzima (ELISA) foram escolhidos para fusão subsequente. Os baços e nodos linfáticos dos camundongos apropriados foram coletados. As células B foram então colhidas e fundidas com uma linhagem de mieloma. Os produtos de fusão foram diluídos seriadamente em uma ou mais placas até próximo da clonalidade. Os sobrenadantes das fusões resultantes foram examinados quanto a sua ligação a hHGF por ELISA. Os sobrenadantes identificados como contendo anticorpos para HGF foram caracterizados posteriormente por um teste funcional *in vitro* discutido nos exemplos seguintes. Um painel de hibridomas foi selecionado e os hibridomas foram subclonados e expandidos. Os anticorpos monoclonais foram então purificados por cromatografia de afinidade sobre resina de Proteína A/G sob condições usuais.

Exemplo 2 – Análise de Seqüência de Anticorpos Monoclonais anti-hHGF

Este exemplo descreve as análises de isotipo e seqüência dos anticorpos monoclonais anti-hHGF produzidos no Exemplo 1.

25 a. Determinação dos Isotipos dos Anticorpos Monoclonais Murinos de HGF

O tipo de cadeia leve e o isotipo de cadeia pesada de cada anticorpo monoclonal foram determinados usando o kit IsoStrip Mouse Monoclonal Antibody Isotyping de acordo com as instruções do fabricante (Roche Applied Science).

30 Foi determinado que todos os anticorpos continham uma cadeia leve kappa de imunoglobulina e uma cadeia pesada de imunoglobulina de IgG1.

b. Determinação das Seqüências de Nucleotídeo que Codificam as Regiões Variáveis de Cadeia Pesada e Leve

O RNA total foi extraído de cada linhagem celular de hibridoma monoclonal usando o kit RNeasy Miniprep de acordo com as instruções do fabricante (Qiagen Venlo, Holanda). A primeira fita de cDNA de extensão completa foi gerada usando o kit de amplificação de cDNA BD SMART® RACE de acordo com as instruções do fabricante (Clontech) usando os iniciadores de oligonucleotídeo BD SMART II A (5' aagcagtggatcaacgcagagtacgcggg 3') (SEQ ID N°: 85) e o iniciador 5'-RACE CDS (5' tttttttttttttttttttvn 3', onde v = a, g, ou c e n = a, g, c, ou t) (SEQ ID N°: 86) com a finalidade de 5' RACE (Rápida Amplificação das Extremidades do cDNA).

As regiões variáveis das cadeias de imunoglobulina Pesada (IgG1) e Kappa foram amplificadas por PCR (Reação em Cadeia da Polimerase) usando o Sistema Expand High-Fidelity PCR System (Roche Applied Science) de acordo com as instruções do fabricante. As regiões variáveis de cadeia pesada foram amplificadas com a mistura de iniciadores de oligonucleotídeo 5' Universal Primer Mix A (mistura de 5' ctaatacgactcactatagggcaagcagtggatcaacgcagagt 3' (SEQ ID N°: 87) e 5' ctaatacgactcactatagggc 3'(SEQ ID N°: 88)) e um 3' iniciador específico para a região constante de IgG1, ou 5' tatgcaaggcttacaaccaca 3' (SEQ ID N°: 89) ou 5' gccagtggatagacagatgggggtgtcg 3' (SEQ ID N°: 90). As regiões variáveis de cadeia Kappa foram amplificadas com a mistura de iniciador de oligonucleotídeo 5' Universal Primer Mix A e um iniciador específico para a Região Constante Kappa 3', ou 5' ctattcctgttgaagctcttgacaat 3' (SEQ ID N°: 91) ou 5' cgactgaggcacctccagatgtt 3' (SEQ ID N°: 92).

Os produtos de PCR individuais foram fracionados por eletroforese em gel de agarose e purificados usando o kit Qiaquick Gel Purification de acordo com as instruções do fabricante (Qiagen). Os produtos de PCR foram subseqüentemente clonados no plasmídeo pCR2.1 TOPO usando o kit de clonagem baseado em topoisomerase TOPO TA Cloning® Kit (com o vetor pCR®2.1-TOPO®) de acordo com as instruções do fabricante (Invitrogen, Carlsbad, CA) e transformados em bactérias DH5 usando técnicas de

transformação usuais. O DNA de plasmídeo isolado dos clones bacterianos transformados foi seqüenciado usando os iniciadores de T7 (5' TAATAC-GACTCACTATAGGG 3') (SEQ ID Nº: 93), de M13 de sentido direto (5' GTAAAACGACGGCCAGT 3') (SEQ ID Nº: 94), e de M13 de sentido reverso (5' CAGGAAACAGCTATGACC 3') (SEQ ID Nº: 95) por Agencourt Bioscience usando métodos de seqüenciamento de didesoxi DNA usuais para identificar a seqüência das seqüências da região variável. As seqüências foram analisadas usando o programa Vector NTI (Invitrogen, Carlsbad, CA) e o servidor da internet IMGT/V-Quest (<http://imgt.cines.fr/textes/vquest>) para identificar e confirmar as seqüências da região variável.

c. Determinação das seqüências de nucleotídeo que codificam as seqüências da região constante da cadeia pesada e leve de imunoglobulina para as cadeias kappa e de IgG1 de 1A3, 1D3, 1F3, e 2B8

cDNAs de extensão completa para as cadeias de IgG1 de 1A3, 1D3, e 1F3 foram amplificados por PCR a partir do cDNA criado acima usando o seguinte iniciador de sentido direto 5' ggggacaagtttgtaaaaaagcaggctgccaccatggaactttgggctcagattgattttcc 3' (códon de início sublinhado) (SEQ ID Nº: 96) e o iniciador de sentido reverso 5' ggggaccactttgtacaagaaagctgggttcattaccaggagagtgggagagg 3' (códon de parada sublinhado) (SEQ ID Nº: 97). cDNA de extensão completa para a cadeia de IgG1 de 2B8 foi amplificada a partir do cDNA criado acima usando o seguinte iniciador de sentido direto 5' ggggacaagtttgtaaaaaagcaggctgccaccatgggatggagctatatcatcctcttt 3' (códon de início sublinhado) (SEQ ID Nº: 98) e iniciador de sentido reverso 5' ggggaccactttgtacaagaaagctgggttcattaccaggagagtgggagag 3' (códon de parada sublinhado) (SEQ ID Nº: 99).

cDNA de extensão completa para a cadeia Kappa de 2B8 foi amplificado usando o seguinte iniciador de sentido direto 5' ggggacaagtttgtaaaaaagcaggctgccaccatggaatcacagactctggtcttcata 3' (códon de início sublinhado) (SEQ ID Nº: 100) e o iniciador de sentido reverso 5' ggggaccactttgtacaagaaagctgggtctaacactcattcctgttgaagctc 3' (códon de parada sublinhado) (SEQ ID Nº: 101). Os fragmentos de PCR foram subclo-

nados em pDONR221 (Invitrogen, Carlsbad, CA) por reação de recombinação Gateway BP (Invitrogen, Carlsbad, CA) e seqüenciados por Agencourt Bioscience usando métodos de seqüenciamento de didesoxi DNA usuais para identificar a seqüência da região constante e confirmar adicionalmente as seqüências da região variável.

d. Análise de seqüência

As regiões variáveis (texto normal) foram identificadas usando o servidor da internet IMGT/V-QUEST (<http://imgt.cines.fr/textes/vquest/>). As seqüências de Peptídeo de Sinal foram previstas com base na identificação do códon de início *in frame* (ATG) que estava à montante da Região Variável identificada. As seqüências de peptídeo de sinal foram identificadas e estão sublinhadas abaixo.

O último nucleotídeo de cada região variável é a primeira base do próximo códon gerado pela junção da região variável/constante. Este nucleotídeo está incluído na região variável porque ele é parte deste éxon. As seqüências de aminoácido das regiões constantes listadas abaixo incluem a tradução deste códon de junção.

A fim de criar as seqüências do anticorpo da cadeia pesada ou kappa completas, as seqüências da região variável observadas abaixo são combinadas com suas respectivas seqüências da região constante (as seqüências de sinal estão sublinhadas).

(1) Região Variável da Cadeia Pesada de 1A3 (SEQ ID Nº: 1)

1 atqaactttg ggctcagatt gattttcctt gtcctgttt taaaaggtgt gaagtgtgaa
 61 gtcagactgg tggagtctgg gggaggctta gtcagcctg gagggtccct gaaactctcc
 121 tgtgcagcct ctgaattcac tttagtaac tattacatgt cttgggttcg ccagactcca
 181 gagaagaggc tgcagtgggt cgcatacatt agtcctggtg gtggtagctc ctactatcca
 241 gccagtgtga agggctgatt caccatctcc agagacaatg ccaagaacac cctgtacctg
 301 caaatgagca gtctgaagtc tgaggacaca gccatgtatt actgtgcaag acaaggggat
 361 ggttactacg gggactatgc tatggactac tggggtaag gaacctcagt caccgtctcc
 421tcag

(2) Região Variável da Cadeia Leve Kappa de 1A3 (SEQ ID Nº: 3)

1 atgagtgtgc ccactcaggt cctgaggttg ctgctctgtt ggcttacaga tgccaqatgt

61 gacatccaga tgactcagtc tccagcctcc ctatctgttt ctgtgggaga aactgtcacc
 121 atcacatgtc gagcaagtga gaatattat agtaatttag catggatca gcagaaacag
 181 ggaaaatctc ctacagctct ggtctatgct gcaacaaact tagcagatgg tgtgcatca
 241 aggttcagtg gcagtggatc aggcacacag tttccctca agatcaacag cctgcagctc
 5 301 gaagatttg ggacttatta ctgtcaacat tttggggta ctccgtacac gttcggaggg

361gggaccaagc tggaataaa ac

(3) Região Variável da Cadeia Pesada de 2B8 (SEQ ID Nº: 11)

1 atgggatgga gctatatcat cctcttttg gtagcaacag ctacagatgt ccaactccag
 61 gtccaactgc agcagcctgg ggctgaactg gtgaagcctg ggacttcagt gaagctgtcc
 10 121 tgcaaggctt ctggctacac cttcaccacc tactggatgc actgggtgaa tcagaggcct
 181 ggacaaggcc ttgagtggat tggagagatt aatcctacca acggtcatac taactacaat
 241 gagaagtca agagcaaggc cacactgact gtagacaaat cctccagcac agcctacatg
 301 caactcagca gctgacatc tgaggactct gcggtctatt actgtgcaag aaactatgtt

361ggtagcatct ttgactactg gggccaaggc accactctca cagtctcctc ag

15 (4) Região Variável da Cadeia Leve Kappa de 2B8 (SEQ ID Nº: 13)

1 atggaatcac agactctggt ctccatattc atactgctct ggttatatgg tctgtaggg
 61 aacattgtaa tgaccaatc tcccaatcc atgtccatgt cagtaggaga gagggtcacc
 121 ttgagctgca aggccagtga gaatgtggtt tcttatgtat cctggatca acagaaacca
 181 gcgcagcttc ctactgct gatatacggg gcatccaacc ggaacactgg ggtccccgat
 20 241 cgcttcacag gcagtggatc tgcaacagat ttactctga ccatcagcag tgtgccccgt
 301 gaagaccttg cagattatca ctgtgggcag agttacaact atccgtacac gttcggaggg

361gggaccaggc tggaataaa ac

(5) Região Variável da Cadeia Pesada de 2F8 (SEQ ID Nº: 21)

1 atggaatgga gctgggtctt tctctcctc ctgtcagtaa ctgcaggtgt ccaactgccag
 25 61 gtccagctga agcagctctgg agctgagctg gtgaggcctg ggacttcagt gaagatgtcc
 121 tgcaaggctt ctggctacac cttcactacc tactatatac actgggtgaa tcagaggcct
 181 ggacagggcc ttgagtggat tggaaagatt ggtcctggaa gtggtagtagc ttactacaat
 241 gagatgttca aagacaaggc cacattgact gtagacacat cctccagcac agcctacatg
 301 cagctcagca gctgacatc tgacgactct gcggtctatt tctgtgcaag aaggggactg

30 361ggacgtggct ttgactactg gggccaaggc accactctca cagtctcctc ag

(6) Região Variável da Cadeia Leve Kappa de 2F8 (SEQ ID Nº: 23)

1 atggagacag acacaatcct gctatgggtg ctgctgctct ggttccagg ctccactggt

61 gacattgtgc tgaccaatc tccagcttct ttggctgtgt ctctagggca gagggccacc
 121 atctcctgca aggccagcca aagtgtgat tatgatgga atagttatat caactggtac
 181 caacagaaac caggacagcc acccaaagtc ctcatctatg ttgcatcaa tctagaatct
 241 gggatcccag ccaggttag tggcagtggg tctgggacag acttcaccct caacatccat
 5 301 cctgtggagg aggaggatgc tgcaacctat tactgtcagc aaagtattga ggatcctccc
 361 acgttcggtg ctgggacca gctggagctg aaac

(7) Região Variável da Cadeia Pesada de 3B6 (SEQ ID Nº: 31)

1 atggaatgac ctgtatctt tctcttctc ctgtcagtaa ctgaaggtgt ccaactcccag
 61 gttcagctgc agcagctcgg ggctgaactg gtgaggcctg ggtcctcagt gaagatttcc
 10 121 tgcaaggctt ctggctatgt attcagtagc tactggatga actgggtgaa gcagaggcct
 181 ggacagggtc ttgagtggat tggacagatt tatcctggag atggatag taactacaat
 241 ggaaactca aggtaaagc cacactgact gcagacaaat cctccagtac agcctacatg
 301 cagctcagca gctaaccatc tgaggactct gcggtctatt tctgtcatc ccagctcggg
 361 ctacgtgaga actacttga ctactggggc caaggcacca ctctcacagt ctctcag

15 (8) Região Variável da Cadeia Leve Kappa de 3B6 (2 possíveis códons de início ATG (letras maiúsculas)) (SEQ ID Nº: 33)

1 ATGgacATGa ggaccctgc tcagtttctt ggaatctgt tctctggtt tccaggtatc
 61 aaatgtgaca tcaagatgac ccagctcca tctccatgt atgcatctct aggagagaga
 121 gtcacaatca ctgcaaggc gagtcaggac ataaaagct atttaagctg gttccagcag
 20 181 aaaccagga aatctctaa gaccctgac tatcgtgtaa acagattggt agatggggtc
 241 ccatcaaggt tcagtggcag tggatctggg caagattctt ctctaccat caccagcctg
 301 gagaatgaag atatgggaat ttattattgt ctacagtatg atgagtttcc gttcacgttc
 361 ggagggggga ccaagctgga aataaagc

(9) 3D11 Região Variável da Cadeia Pesada (SEQ ID Nº: 41)

25 1 atggctgcc cgggtctgtt cctctgcctg gttgcatttc caagctgtgt cctgtcccag
 61 gtacagctga aggagtcagg acctggcctg gtggcgcct cacagagcct gtccatcact
 121 tgcactgtct ctgggtttc attaaccagc tatagtttac actgggttcg ccagcctcca
 181 ggaaagggc tggaatggct gggagtaata tgggctggtg gaaacacaaa ttataattcg
 241 tctctcatgt ccagactgac catcaggaaa gacaactcca agagccaagt ttcttaaaa
 30 301 atgaacagtc tgcaactga tgacacagcc atgtactact gtgccagaga gaggtttgc
 361 tactggggcc aaggactct ggtcactgtc tctgag

(10) Região Variável da Cadeia Leve Kappa de 3D11 (SEQ ID Nº: 43)

1 atggatttc aagtgcagat tttcagcttc ctgctaataca gtgcctcagt caaaatatcc
 61 agaggacaaa ttgtctcac ccagctcca gcaatcatgt ctgcatatcc aggggagaag
 121 gtcacatga cctgcagtgc cagctcaagt gtaagtaca tgcactggta ccagcagaag
 181 tcaggcacct cccccaaaag atggattat gacacatcca aactggcttc tggagtccct
 5 241 gctcgctca gtggcagtgg gtctgggacc tctactccc tcacaatcag tagtatggag
 301 gctgaagatg ctgccactia ttactgccag cagtggagta gtaaccact cacgttcggt
 361 gctgggacca agctggagct gaaac

(11) Região Variável da Cadeia Pesada de 1D3 (SEQ ID Nº: 51)

1 atgaacttg ggctcagatt gatttcctt gtcctgttt taaaagggtg gaagtgtgaa
 10 61 gtgcagctgg tggagtctgg gggaggctta gtgcagctg gagggccct gaaactctcc
 121 tgtgcagcct ctggattcac tttcagtgac tattacatgt ctggggtcg ccagactcca
 181 gagaagagggc tggagtgggt cgcatacatt agtagtggtg gtgtagcac ctactatcca
 241 gacagtgtga agggctgatt caccatctcc cgagacaatg ccaagaacac cctgtacctg
 301 caaatgagca gtctgaagtc tggagacaca gccatatatt actgtgtgag acaaggggat
 15 361 ggttattacg gggactatgc tatggactac tggggtaag gaacctcagt catcgtctcc
 421 tcag

(12) Região Variável da Cadeia Leve Kappa de 1D3 (SEQ ID Nº: 53)

1 atgagtgtgc ccactcaggt cctggggttg ctgctgctgt ggcttacaga tgcagatgt
 61 gacatccaga tgactcagtc tccagcctcc ctatctgtat ctgtgggaga aactgtcacc
 20 121 atcacatgtc gaacaagtga gaattttac agtaatttag ctggtatca gcagaaacag
 181 ggaaaatctc ctgagctcct aatctatgct gcaacaaact tagcagatgg tgtgcatca
 241 aggtcagtg gcagtggatc aggcacacag tttccctca ggatcaacag cctgcagtct
 301 gaagatttg ggaggtatta ctgtcaacat tttggggga ctccgtacac gtcggaggg
 361 gggaccaaac tggaaataaa ac

25 (13) Região Variável da Cadeia Pesada de 1F3 (SEQ ID Nº: 61)

1 atgaacttg ggctcagatt gatttcctt gtcctgttt taaaagggtg gaagtgtgag
 61 gtgcagctgg tggagtctgg gggaggctta gtgcagctg gagggccct gaaactctcc
 121 tgtgcccct ctggattcac tttcagtaac tattcatgt ctggggtcg ccagactcca
 181 gagaagagggc tggagtgggt cgcatacatt agtagtggtg gtgtagcac ctactatcca
 30 241 gacagtgtga agggctgatt caccatctct agagacaatg ccaagaacac cctgtacctg
 301 caaatgagca gtctgaagtc tggagacaca gccatgtatt actgtgtaag acaaggggat
 361 ggttactacg gggactatgc tatggactac tggggtaag gaacctcagt caccgtctcc

421 tcag

(14) Região Variável da Cadeia Leve Kappa de 1F3 (SEQ ID Nº: 63)

1 atgagtgtgc ccactcaggt cctgggggtg ctgctgctgt ggcttacaga tgccagatgt
 61 gacatccaga tgactcagtc tccagcctcc ctatctgtat ctgtgggaga aactgtcacc
 5 121 atcacatgtc gagcaagtga gaatatttac agtaatttag catggtatca gcagaaacag
 181 ggaaaatctc ctcagctcct ggtctatgat gcaacacact taccagatgg tgtgccatca
 241 aggttcagtg gcagtggatc aggcacacag tttccctca agatcaacag cctgcagtct
 301 gaagattttg ggagttatta ctgtcaacat tttggggta ctccgtacac gtttgagggg
 361 gggaccagac tggaattaa ac

10 (15) Região Variável da Cadeia Pesada de 3A12 (SEQ ID Nº: 71)

1 atgaactttg ggctcagatt gattttcctt gtcctgttt taaaagggtg gaagtgtgaa
 61 gtgcagctgg tggagtctgg gggaggctta gtgcagcctg gagggtccct gaaaatctcc
 121 tgtgcagcct ctggatttac ttcagtaac tattcatgt ctggggtcg ccagactcca
 181 gagaagaggg tggagtgggt cgcatacatt agtagtggtg gtggtagcac ctactatcca
 15 241 gacagtgtga agggctgatt caccatctcc agagacaatg ccaagaacac cctgtacctg
 301 caaatgaaca gtctgaagtc tgaggacaca gccatgtatt actgtgtaag acaaggagat
 361 ggttactatg gggactatgc tatggactac tggggtaag gaacctcagt caccgtctcc
 421 tcag

(16) Região Variável da Cadeia Leve Kappa de 3A12 (SEQ ID Nº: 73)

20 1 atgagtgtgc ccactcaggt cctgggggtg ctgctgctgt ggcttacaga tgccagatgt
 61 gacatccaga tgactcagtc gccagcctcc ctatctgtat ctgtgggaga aactgtcacc
 121 atcacatgtc gagcaagtga gaatatttac attaatttag catggtatca gcagaaacag
 181 ggaaaatctc ctcagctcct ggtccatgct gcaacaaagt tagcagatgg tgtgccatca
 241 aggttcagtg gcagtggatc aggcacacag tattccctca agatcaacag cctgcagtct
 25 301 gaagattttg ggagttatta ctgtcaacat tttggggta ctccgtacac gttcggaggg
 361 gggaccaaac tagaataaa ac

(17) Região Constante da Cadeia Pesada de IgG1 de Camundongo de Referência (J00453) (SEQ ID Nº: 81)

1 ccaaaacgac accccatct gtctatccac tggcccctgg atctgctgcc caaactaact
 30 61 ccatggtgac cctgggatgc ctggcaagg gctatttccc tgagccagtg acagtgacct
 121 ggaactctgg atccctgtcc agcgggtgtc acaccttccc agctgtcctg gagtctgacc
 181 tctacactct gacgagctca gtgactgtcc cctccagccc tcggcccagc gagaccgtca

241 cctgcaacgt tgcccacccg gccagcagca ccaaggtgga caagaaaatt gtgcc-
 caggg
 301 attgtggtg taagccttg atatgtacag tcccagaagt atcatctgtc tcatcttcc
 361 ccccaaagcc caaggatgtg ctaccatta ctctgactcc taaggtaacg tgtgtgtgg
 5 421 tagacatcag caaggatgat cccgaggtcc agttcagctg gttttagat gatgtggagg
 481 tgcacacagc tcagacgcaa ccccgaggagg agcagttcaa cagcacttc cgctcagtca
 541 gtgaactcc catcatgcac caggactggc tcaatggcaa ggagtcaaa tgcagggta
 601 acagtgcagc ttccctgcc cccatcgaga aaaccatctc caaaaccaa ggcagaccga
 661 aggtccaca ggtgtacacc attccacctc ccaaggagca gatggccaag gataaagtca
 10 721 gtctgacctg catgataaca gacttctcc ctgaagacat tactgtggag tggcagtga
 781 atgggcagcc agcggagaac tacaagaaca ctgagccat catgaacacg aatggctct
 841 acttctcta cagcaagctc aatgtgcaga agagcaactg ggaggcagga aatacttca
 901 cctgctctgt gttacatgag ggctgcaca accaccatac tgagaagagc ctctccact
 961 ctctggtaa atga
 15 (18) Região Constante da Cadeia Pesada de IgG1 de Camundongo Deter-
minada para 1A3, 1D3, 1F3, e 2B8 (derivada de camundongo da cepa AJ)
 (SEQ ID N°: 82)
 1 ccaaaacgac accccatct gtctatccac tggcccctgg atctgtgcc caaactaact
 61 ccatggtgac cctgggatgc ctggtcaagg gctatttccc tgagccagtg acagtgaact
 20 121 ggaactctgg atccctgtcc agcgggtgac acacttccc agctgtcctg cagtctgacc
 181 tctacactct gagcagctca gtgactgtcc cctccagcac ctggcccagc gagaccgtca
 241 cctgcaacgt tgcccacccg gccagcagca ccaaggtgga caagaaaatt gtgcc-
 caggg
 301 attgtggtg taagccttg atatgtacag tcccagaagt atcatctgtc tcatcttcc
 25 361 ccccaaagcc caaggatgtg ctaccatta ctctgactcc taaggtaacg tgtgtgtgg
 421 tagacatcag caaggatgat cccgaggtcc agttcagctg gttttagat gatgtggagg
 481 tgcacacagc tcagacgcaa ccccgaggagg agcagttcaa cagcacttc cgctcagtca
 541 gtgaactcc catcatgcac caggactggc tcaatggcaa ggagtcaaa tgcagggta
 601 acagtgcagc ttccctgcc cccatcgaga aaaccatctc caaaaccaa ggcagaccga
 30 661 aggtccaca ggtgtacacc attccacctc ccaaggagca gatggccaag gataaagtca
 721 gtctgacctg catgataaca gacttctcc ctgaagacat tactgtggag tggcagtga
 781 atgggcagcc agcggagaac tacaagaaca ctgagccat catggacaca gatggctct

841 acttcgtcta cagcaagctc aatgtgcaga agagcaactg ggaggcagga aatacttca
 901 cctgctctgt gttacatgag ggctgcaca accaccatac tgagaagagc ctctcccact
 961 ctctggtaa atga

5 (19) Região Constante da Cadeia Leve Kappa de Camundongo de Referência (V00807) e Região Constante da Cadeia Leve Kappa de Camundongo Determinada para 1D3, 1F3, e 2B8 (derivada de camundongo da cepa AJ)
 (SEQ ID Nº: 83)

1 gggctgatgc tgcaccaact gtatccatct tcccaccatc cagtgagcag ttaacatctg
 61 gaggtgcctc agtcgtgtgc ttctgaaca acttctaccc caaagacatc aatgtcaagt
 10 121 ggaagattga tggcagtga cgacaaaatg gcgctcctgaa cagttggact gatcaggaca
 181 gcaaagacag cacctacagc atgagcagca cctcacgtt gaccaaggac gagtatgaac
 241 gacataacag ctatacctgt gaggccactc acaagacatc aacttcaccc attgtcaaga
 301 gcttcaacag gaatgagtgt tag

15 (20) Região Constante da Cadeia Leve Kappa de Camundongo Determinada para 1A3 contendo um nucleotídeo alterado em comparação com 1D3, 1F3, e 2B8 (sublinhados) (SEQ ID Nº: 84)

1 gggctgatgc tgcaccaact gtatccatct tcccaccatc cagtgagcag ttaacatctg
 61 gaggtgcctc agtcgtgtgc ttctgaaca acttctaccc caaagacatc aatgtcaagt
 121 ggaagattga tggcagtga cgacaaaatg gcgctcctgaa cagttggact gatcaggaca
 20 181 gcaaagacag cacctacagc atgagcagca cctcatgtt gaccaaggac gagtatgaac
 241 gacataacag ctatacctgt gaggccactc acaagacatc aacttcaccc attgtcaaga
 301 gcttcaacag gaatgagtgt tag

Cada uma das seqüências de aminoácido que define as regiões variáveis da cadeia pesada de imunoglobulina para os anticorpos produzidos no Exemplo 1 é descrita na Figura 2. Cada uma das seqüências é alinhada com as outras e as seqüências que definem o peptídeo de sinal, CDR₁, CDR₂ e CDR₃ são identificadas por quadrados. A Figura 3 mostra um alinhamento das seqüências de CDR₁, CDR₂ e CDR₃ separadas para cada um dos anticorpos.

30 Cada uma das seqüências de aminoácido que define as regiões variáveis da cadeia leve de imunoglobulina para cada um dos anticorpos produzidos no Exemplo 1 é descrita na Figura 4. Cada uma das seqüências

é alinhada com as outras e as seqüências que definem o peptídeo de sinal, CDR₁, CDR₂ e CDR₃ são identificadas por quadrados. A Figura 5 mostra um alinhamento das seqüências de CDR₁, CDR₂ e CDR₃ separadas para cada um dos anticorpos.

- 5 Por conveniência, a Tabela 1 fornece um quadro de concordância que mostra a correspondência entre as seqüências de anticorpo discutidas neste Exemplo com aquelas apresentadas na Listagem de Seqüência.

Tabela 1

SEQ. ID Nº:	Proteína ou Ácido Nucléico
1	Região Variável da Cadeia Pesada de 1A3 – ácido nucléico
2	Região Variável da Cadeia Pesada de 1A3 – proteína
3	Região Variável da Cadeia Leve (kappa) de 1A3 – ácido nucléico
4	Região Variável da Cadeia Leve (kappa) de 1A3 – proteína
5	CDR ₁ da Cadeia Pesada de 1A3
6	CDR ₂ da Cadeia Pesada de 1A3
7	CDR ₃ da Cadeia Pesada de 1A3
8	CDR ₁ da Cadeia Leve (kappa) de 1A3
9	CDR ₂ da Cadeia Leve (kappa) de 1A3
10	CDR ₃ da Cadeia Leve (kappa) de 1A3
11	Região Variável da Cadeia Pesada de 2B8 – ácido nucléico
12	Região Variável da Cadeia Pesada de 2B8 – proteína
13	Região Variável da Cadeia Leve (kappa) de 2B8 – ácido nucléico
14	Região Variável da Cadeia Leve (kappa) de 2B8 – proteína
15	CDR ₁ da Cadeia Pesada de 2B8
16	CDR ₂ da Cadeia Pesada de 2B8
17	CDR ₃ da Cadeia Pesada de 2B8
18	CDR ₁ da Cadeia Leve (kappa) de 2B8
19	CDR ₂ da Cadeia Leve (kappa) de 2B8
20	CDR ₃ da Cadeia Leve (kappa) de 2B8
21	Região Variável da Cadeia Pesada de 2F8 – ácido nucléico
22	Região Variável da Cadeia Pesada de 2F8 – proteína

SEQ. ID Nº:	Proteína ou Ácido Nucléico
23	Região Variável da Cadeia Leve (kappa) de 2F8 – ácido nucléico
24	Região Variável da Cadeia Leve (kappa) de 2F8 – proteína
25	CDR ₁ da Cadeia Pesada de 2F8
26	CDR ₂ da Cadeia Pesada de 2F8
27	CDR ₃ da Cadeia Pesada de 2F8
28	CDR ₁ da Cadeia Leve (kappa) de 2F8
29	CDR ₂ da Cadeia Leve (kappa) de 2F8
30	CDR ₃ da Cadeia Leve (kappa) de 2F8
31	Região Variável da Cadeia Pesada de 3B6 – ácido nucléico
32	Região Variável da Cadeia Pesada de 3B6 – proteína
33	Região Variável da Cadeia Leve (kappa) de 3B6 – ácido nucléico
34	Região Variável da Cadeia Leve (kappa) de 3B6 – proteína
35	CDR ₁ da Cadeia Pesada de 3B6
36	CDR ₂ da Cadeia Pesada de 3B6
37	CDR ₃ da Cadeia Pesada de 3B6
38	CDR ₁ da Cadeia Leve (kappa) de 3B6
39	CDR ₂ da Cadeia Leve (kappa) de 3B6
40	CDR ₃ da Cadeia Leve (kappa) de 3B6
41	Região Variável da Cadeia Pesada de 3D11 – ácido nucléico
42	Região Variável da Cadeia Pesada de 3D11 – proteína
43	Região Variável da Cadeia Leve (kappa) de 3D11 – ácido nucléico
44	Região Variável da Cadeia Leve (kappa) de 3D11 – proteína
45	CDR ₁ da Cadeia Pesada de 3D11
46	CDR ₂ da Cadeia Pesada de 3D11
47	CDR ₃ da Cadeia Pesada de 3D11
48	CDR ₁ da Cadeia Leve (kappa) de 3D11
49	CDR ₂ da Cadeia Leve (kappa) de 3D11
50	CDR ₃ da Cadeia Leve (kappa) de 3D11
51	Região Variável da Cadeia Pesada de 1D3 – ácido nucléico
52	Região Variável da Cadeia Pesada de 1D3 – proteína

SEQ. ID Nº:	Proteína ou Ácido Nucléico
53	Região Variável da Cadeia Leve (kappa) de 1D3 – ácido nucléico
54	Região Variável da Cadeia Leve (kappa) de 1D3 – proteína
55	CDR ₁ da Cadeia Pesada de 1D3
56	CDR ₂ da Cadeia Pesada de 1D3
57	CDR ₃ da Cadeia Pesada de 1D3
58	CDR ₁ da Cadeia Leve (kappa) de 1D3
59	CDR ₂ da Cadeia Leve (kappa) de 1D3
60	CDR ₃ da Cadeia Leve (kappa) de 1D3
61	Região Variável da Cadeia Pesada de 1F3 – ácido nucléico
62	Região Variável da Cadeia Pesada de 1F3 – proteína
63	Região Variável da Cadeia Leve (kappa) de 1F3 – ácido nucléico
64	Região Variável da Cadeia Leve (kappa) de 1F3 – proteína
65	CDR ₁ da Cadeia Pesada de 1F3
66	CDR ₂ da Cadeia Pesada de 1F3
67	CDR ₃ da Cadeia Pesada de 1F3
68	CDR ₁ da Cadeia Leve (kappa) de 1F3
69	CDR ₂ da Cadeia Leve (kappa) de 1F3
70	CDR ₃ da Cadeia Leve (kappa) de 1F3
71	Região Variável da Cadeia Pesada de 3A12 – ácido nucléico
72	Região Variável da Cadeia Pesada de 3A12 – proteína
73	Região Variável da Cadeia Leve (kappa) de 3A12 – ácido nucléico
74	Região Variável da Cadeia Leve (kappa) de 3A12 – proteína
75	CDR ₁ da Cadeia Pesada de 3A12
76	CDR ₂ da Cadeia Pesada de 3A12
77	CDR ₃ da Cadeia Pesada de 3A12
78	CDR ₁ da Cadeia Leve (kappa) de 3A12
79	CDR ₂ da Cadeia Leve (kappa) de 3A12
80	CDR ₃ da Cadeia Leve (kappa) de 3A12

Também, por conveniência, as seguintes seqüências representam as seqüências de cadeia pesada e leve de extensão completa reais ou

contempladas (isto é, contendo ambas as seqüências da região variável e constante) para cada um dos anticorpos descritos neste Exemplo. Observa-se que as regiões constantes dos anticorpos murinos 2F8, 3A12, 3B6, e 3D11 não foram seqüenciadas, mas supõe-se que tenham as mesmas seqüências de região constante que os anticorpos 1D3, 1F3, e 2B8, os quais foram seqüenciados, já que eles todos foram derivados do camundongo da cepa AJ. É observado, entretanto, que as seqüências da região variável descritas aqui podem ser ligadas a cada uma de várias seqüências de região constante conhecidas daqueles versados na técnica para produzir cadeias pesadas e leves ativas de imunoglobulina de extensão completa.

(1) Seqüência de Ácido Nucléico que Codifica a Seqüência da Cadeia Pesada de Extensão Completa de 1A3 (Região Variável da Cadeia Pesada de 1A3 e Região Constante de IgG1) (seqüência de sinal sublinhada) (SEQ ID Nº: 122)

15	1	<u>atgaacttg gqctcagatt gatttcctt gtcctgttt taaaaggtgt gaagtgtgaa</u>
	61	gtgcagctgg tggagtctgg gggaggctta gtgcagcctg gagggctcct gaaactctcc
	121	tgtgcagcct ctgaattcac ttcagtaac tattacatgt ctggggtcgc ccagactcca
	181	gagaagaggc tgcagtgggt cgcatacatt agtcctgggtg gtggtagctc ctactatcca
	241	gccagtgtga agggctgatt caccatctcc agagacaatg ccaagaacac cctgtacctg
20	301	caaatgagca gtctgaagtc tgaggacaca gccatgtatt actgtgcaag acaaggggat
	361	ggttactacg gggactatgc tatggactac tggggcaag gaacctcagt caccgtctcc
	421	tcagccaaaa cgacaccccc atctgtctat cactggccc ctggatctgc tgccaaaact
	481	aactccatgg tgacctggg atgcctggtc aagggtatt tcctgagcc agtgacagtg
	541	acctggaact ctggatccct gtccagcgggt gtgcacacct tccagctgt cctgcagtct
25	601	gaccttaca ctctgagcag ctcagtgact gtcccctcca gcacctggcc cagcgagacc
	661	gtcacctgca acgttgcca cccggccagc agcaccaagg tggacaagaa aattgtgccc
	721	agggattgtg gttgtaagcc ttgcatatgt acagtcccag aagtatcatc tgtcttcatc
	781	ttcccccaa agcccaagga tgtgctcacc attactctga ctctaaggt cacgtgtgt
	841	gtggtagaca tcagcaagga tgatcccag gtccagttca gctggtttgt agatgatgtg
30	901	gaggtgcaca cagctcagac gcaaccccg gaggagcagt tcaacagcac ttccgctca
	961	gtcagtgaac ttccatcat gcaccaggac tggctcaatg gcaaggagtt caaatgcagg
	1021	gtcaacagtg cagcttccc tgccccatc gagaaaacca tctccaaaac caaaggcaga

1081 ccgaaggctc cacaggtgta caccattcca cctccaagg agcagatggc caaggataaa
 1141 gtcagctga cctgcatgat aacagacttc ttccctgaag acattactgt ggagtggcag
 1201 tggatgggc agccagcgga gaactacaag aacactcagc ccatcatgga cacagatggc
 1261 tcttactcg tctacagcaa gtcaatgtg cagaagagca actgggaggc aggaaatact
 5 1321 ttcacctgct ctgtgtaca tgaggcctg cacaaccacc atactgagaa gagcctctcc
 1381 cactctcctg gtaaatga

(2) Seqüência de Proteína que Define a Seqüência da Cadeia Pesada de Extensão Completa de 1A3 (Região Variável da Cadeia Pesada de 1A3 e Região Constante de IgG1) (sem seqüência de sinal) (SEQ ID Nº: 123)

10 1 evqlvesggg lvqpggskl scaaseffs nyymwvvrqt pekrlqwvay ispgggssyy
 61 pasvkgftri srdnakntly lqmssksed tamyycarq dgyygyamd ywgqgtsvtv
 121 ssaktppsv yplapgsaaq tnsmtlglcl vkgyfpepvt vtwnsgslss gvhtfpavlg
 181 sdlytlsssv tpsstwpse tvtcnvahpa sstkvdkkiv prdcgckpci ctvpevssvf
 241 ifppkpkdvl titltpkvtc vvdiskddp evqfswfvdd vevhtaqtqp reeqfnstfr
 15 301 svselfimhq dwlngkefkc rvnsaafpap iektisktkg rpkapqvyti pppkeqmakd
 361 kvsltcmid ffpeditvew qwngqpaeny kntqpimtdt gsyfvyskln vqksnweagn
 421 tftcslhleg lnhhhteksl shspgk

(3) Seqüência de Ácido Nucléico que Codifica a Seqüência da Cadeia Leve de Extensão Completa de 1A3 (Região Variável Kappa e Região Constante de 1A3) (seqüência de sinal sublinhada) (SEQ ID Nº: 124)

20 1 atgagtgtgc ccaactcaggt cctggggttg ctgctactgt gacttacaga tgccagatgt
 61 gacatccaga tgactcagtc tccagcctcc ctatctgttt ctgtgggaga aactgtcacc
 121 atcacatgtc gagcaagtga gaattattat agtaatttag catggatca gcagaaacag
 181 ggaaaatctc ctcagctcct ggtctatgct gcaacaaact tagcagatgg tgtgccatca
 25 241 aggttcagtg gcagtggatc aggcacacag tttccctca agatcaacag cctgcagtct
 301 gaagattttg ggacttatta ctgtcaacat ttttgggta ctccgtacac gticggaggg
 361 gggaccaagc tggaaataaa acgggctgat gctgcaccaa ctgtatccat ctcccacca
 421 tccagtgagc agtaacatc tggagtgcc ttagtcgtgt gcttctgaa caactctac
 481 cccaagaca tcaatgcaa gtggaagatt gatggcagtg aacgacaaa tggcgtcctg
 30 541 aacagttgga ctgatcagga cagcaaagac agcacctaca gcatgagcag caccctcatg
 601 ttgaccaagg acgagtatga acgacataac agctatacct gtgaggccac tcacaagaca
 661 tcaactcac ccattgtcaa gagctcaac aggaatgagt gttag

(4) Seqüência de Proteína que Define a Seqüência da Cadeia Leve de Extensão Completa de 1A3 (Região Variável Kappa e Região Constante) (sem seqüência de sinal) (SEQ ID Nº: 125)

1 diqmtqspas lsvsvgetvt itcraseny snlawyqqkq gkspqllvya atnladgvps
 5 61 rfgsgsgtgq fslkinslqs edfgtyycqh fwgtpyftgg gtleikrad aaptvsifpp
 121 sseqiltsgga svvcflnnfy pkdinvkwki dgserqngvl nswtdqdskd stysmsstlm
 181 ltkdeyerhn sytceathkt stspivksfn nec

(5) Seqüência de Ácido Nucléico que Codifica a Seqüência da Cadeia Pesada de Extensão Completa de 2B8 (Região Variável da Cadeia Pesada e Região Constante de IgG1 de 2B8) (seqüência de sinal sublinhada) (SEQ ID Nº: 126)

1 atgggatgga gctatatcat cctcttttg gtagcaacaq ctacagatgt ccactcccag
 61 gtccaactgc agcagcctgg ggctgaactg gtgaagcctg ggacttcagt gaagctgtcc
 121 tgcaaggctt ctggctacac ctcaccacc tactggatgc actgggtgaa tcagaggcct
 15 181 ggacaaggcc ttgagtggat tggagagatt aatcctacca acggctacac taactacaat
 241 gagaagtca agagcaaggc cacactgact gtagacaaat cctccagcac agcctacatg
 301 caactcagca gcctgacatc tgaggactct gcggtctatt actgtgcaag aaactatggt
 361 ggtagcatct ttgactactg gggccaaggc accactctca cagtctctc agccaaaacg
 421 acacccccat ctgtctatcc actggcccct ggatctgctg cccaaactaa ctccatggtg
 20 481 accctgggat gcctggtaaa gggctattc cctgagccag tgacagtgc ctggaactct
 541 ggatccctgt ccagcgggtg gcacaccttc ccagctgtcc tgcagtctga cctctacact
 601 ctgagcagct cagtgactgt ccctccagc acctggccca gcgagaccgt cacctgcaac
 661 gttgccacc cggccagcag caccaagggtg gacaagaaaa ttgtgccag ggattgtggt
 721 tgtaagcctt gcatatgtac agtcccagaa gtatcatctg tcttcatctt cccccaaag
 25 781 cccaaggatg tgctaccat tactctgact cctaagggtca cgtgtgtgtg gtagacatc
 841 agcaaggatg atcccaggt ccagttcagc tggttttag atgatgtgga ggtgcacaca
 901 gctcagacgc aaccccgga ggagcagttc aacagcactt tccgctcagt cagtgaact
 961 cccatcatgc accaggactg gctcaatggc aaggagtca aatgcagggt caacagtgca
 1021 gctttccctg ccccatcga gaaaaccatc tccaaaacca aaggcagacc gaaggctcca
 30 1081 cagggtgaca ccattccacc tccaaggag cagatggcca aggataaagt cagtctgacc
 1141 tgcataataa cagactctt cctgaagac attactgtgg agtggcagtg gaatgggcag
 1201 ccagcggaga actacaagaa cactcagccc atcatggaca cagatggctc ttactctgct

1261 tacagcaagc tcaatgtgca gaagagcaac tgggaggcag gaaatacttt cacctgctct
 1321 gtgttacatg agggcctgca caaccacat actgagaaga gcctctcca ctctctggt
 1381 aaatga

5 (6) Seqüência de Proteína que Define a Seqüência da Cadeia Pesada de Extensão Completa de 2B8 (Região Variável da Cadeia Pesada e Região Constante de IgG1 de 2B8) (sem seqüência de sinal) (SEQ ID Nº: 127)

1 qvqlqqpgae lvkpgtsvkl sckasgyft tywmhwnqr pggglewige inptnghtny
 61 nekfskatl tvdkssstay mqlssltted savyycarny vgsifydwgq gttltvssak
 121 ttpsvypla pgsaaqtnsm vtlgclvkg yfpepvtwn sgsissgvht fpavqlsdly
 10 181 tlsssvtpps stwpsetvtc nvahtpasstk vdkkivprdc gckpcictvp evssvfifpp
 241 kpkdvlitl tpkvtcvvd iskddpevqf swfvddvevh taqtqpreeq fnstfrsvse
 301 lpimhqdwln gkefkcrvns aafpapiekt isktkgrpka pqvytipppk eqmakdkvsl
 361 tcmidffpe ditvewqwn gpaenykntq pimtdgsyf vysklnvqks nweagntftc
 421 svlheglhnh htekslshsp gk

15 (7) Seqüência de Ácido Nucléico que Codifica a Seqüência da Cadeia Leve de Extensão Completa de 2B8 (Região Variável Kappa e Região Constante de 2B8) (seqüência de sinal sublinhada) (SEQ ID Nº: 128)

1 atggaatcac agactctggt ctctcatatcc atactgctct gttatatgg tgctgatggg
 61 aacattgtaa tgaccaatc toccaaatcc atgtccatgt cagtaggaga gagggtcacc
 20 121 ttgagctgca aggccagga gaatgtggtt tcttatgtat cctggatca acagaaacca
 181 ggcagctctc cttaaactgct gatatacggg gcatccaacc ggaacactgg ggtccccgat
 241 cgcttcacag gcagtggatc tgcaacagat ttactctga ccatcagcag tggcgggct
 301 gaagacctg cagattatca ctgtgggcag agttacaact atccgtacac gttcggaggg
 361 gggaccaggc tggaaataaa acgggctgat gctgcaccaa ctgtatccat ctcccacca
 25 421 tccagtgagc agttaacatc tggaggtgcc tcagtcgtgt gcttctgaa caactctac
 481 cccaagaca tcaatgtcaa gtggaagatt gatggcagtg aacgacaaaa tggcgtcctg
 541 aacagttgga ctgatcagga cagcaaagac agcacctaca gcatgagcag caccctcag
 601 ttaccaagg acgagtatga acgacataac agctatacct gtgaggccac tcacaagaca
 661 tcaactcac ccattgtcaa gagctcaac aggaatgagt gttag

(8) Seqüência de Proteína que Define a Seqüência da Cadeia Leve de Extensão Completa de 2B8 (Região Variável Kappa e Região Constante de 2B8) (sem seqüência de sinal) (SEQ ID Nº: 129)

1 nivmtqspsks msmsvgervt lsckasenvv syvswyqqkp aqspklliyg asnrntgvpd
 5 61 rftgsgsatd flltissvra edladyhcgq synypytfgg gtrleikrad aaptvsifpp
 121 sseqltsgga svvcflnnfy pkdinvkwki dgserqngvi nswtdqskd stysmsstlt
 181 ltkdeyerhn sytceathkt stspivksfn rnc

(9) Seqüência de Ácido Nucléico que Codifica a Seqüência da Cadeia Pesada de Extensão Completa de 2F8 (Região Variável da Cadeia Pesada e Região Constante de IgG1 de 2F8) (seqüência de sinal sublinhada) (SEQ ID Nº: 130)

1 atggaatgga gctgggtctt tctctcctc ctgtcagtaa ctgcaggtgt ccaactgccag
 61 gtccagctga agcagctctgg agctgagctg gtgaggcctg ggacttcagt gaagatgtcc
 121 tgcaaggctt ctggctacac cttcactacc tactatatac actgggtgaa tcagaggcct
 15 181 ggacagggcc ttgagtggat tggaaagatt ggtcctggaa gtggtagtag tactacaat
 241 gagatgttca aagacaaggc cacattgact gtagacacat cctccagcac agcctacatg
 301 cagctcagca gcctgacatc tgacgactct gcggtctatt tctgtgcaag aaggggactg
 361 ggacgtggct ttgactactg gggccaaggc accactctca cagtctctc agccaaaacg
 421 acacccccat ctgtctatcc actggcccct ggatctgctg cccaaactaa ctccatggtg
 20 481 accctgggat gcctgtgcaa gggctatttc cctgagccag tgacagtgac ctggaactct
 541 ggatccctgt ccagcgggtg gcacacctc ccagctgtcc tgcagctgta cctctacact
 601 ctgagcagct cagtgactgt cccctccagc acctggccca gcgagaccgt cacctgcaac
 661 gttgccacc cggccagcag caccaagggt gacaagaaaa ttgtgccag ggattgtggt
 721 tgtaagcctt gcatatgtac agtcccagaa gtatcatctg tctcatctt cccccaaag
 25 781 cccaaggatg tgctcacat tactctgact cctaaggta cgtgtgtgt ggtagacatc
 841 agcaaggatg atcccagggt ccagttcagc tggttgtag atgatgtgga ggtgcacaca
 901 gctcagacgc aacccggga ggagcagttc aacagcactt tccgctcagt cagtgaactt
 961 cccatcatgc accaggactg gctcaatggc aaggagtca aatgcaggggt caacagtgca
 1021 gcttccctg ccccatcga gaaaaccatc tccaaaacca aaggcagacc gaaggctcca
 30 1081 cagggtgaca ccattccacc tccaaggag cagatggcca aggataaagt cagtctgacc
 1141 tgcataataa cagacttct cctgaagac attactgtgg agtggcagtg gaatgggcag
 1201 ccagcggaga actacaagaa cactcagccc atcatggaca cagatggctc ttactcgtc

1261 tacagcaagc tcaatgtgca gaagagcaac tgggaggcag gaaatacttt cacctgctct
 1321 gtgttacatg agggcctgca caaccacat actgagaaga gcctctcca ctctcctggt
 1381 aaatga

5 (10) Seqüência de Proteína que Define a Seqüência da Cadeia Pesada de Extensão Completa de 2F8 (Região Variável da Cadeia Pesada e Região Constante de IgG1 de 2F8) (sem seqüência de sinal) (SEQ ID Nº: 131)

1 qvqlkqsgae lvrpgtsvkm sckasgyft tyihwvnqr pgqglewigk igpgsgstyy
 61 nemfkdkatl tvdtssstay mqlssltsdd savyfcarrg lgrgfdywgq gttltvssak
 121 ttpsavypla pgsaaqtnsm vtlgclvkgy fpepvtvtnw sgslssgvht fpavilqsdly
 10 181 tlsssvtpps stwpsetvtc nvahtpasstk vdkkivprdc gckpcictvp evssvfifpp
 241 kpkdvlitil tpkvtcvvvd iskddpevqf swfvdddevh taqtqpreeq fnstfrsvse
 301 lpimhqdwln gkefkcrvns aafpapiekt isktkgrpka pqvytipppk eqmakdkvsl
 361 tcmitdffpe ditvewqwnq qpaenykntq pimtdtdgsyf vysklvqks nweagntftc
 421 svlheglhnh htekslshsp gk

15 (11) Seqüência de Ácido Nucléico que Codifica a Seqüência da Cadeia Leve de Extensão Completa de 2F8 (Região Variável Kappa e Região Constante de 2F8) (seqüência de sinal sublinhada) (SEQ ID Nº: 132)

1 atggagacag acacaatcct gctatgggtg ctgctgctct gggttccagg ctccactggt
 61 gacattgtgc tgaccaatc tccagcttct ttggctgtgt ctctagggca gagggccacc
 20 121 atctcctgca aggccagcca aagtgtgat tatgatggta atagtatat caactggatc
 181 caacagaaac caggacagcc acccaaagtc ctcatctatg ttgcatcaa tctagaatct
 241 gggatcccag ccaggtttag tggcagtggg tctgggacag acttcaccct caacatccat
 301 cctgtggagg aggaggatgc tgcaacctat tactgtcagc aaagtattga ggatcctccc
 361 acgttcggtg ctgggaccaa gctggagctg aaacgggctg atgctgcacc aactgtatcc
 25 421 atcttccac catccagtga gcagtaaca tctggagggtg cctcagtcgt gtgcttcttg
 481 aacaacttct accccaaaga catcaatgac aagtggaaga ttgatggcag tgaacgacaa
 541 aatggcgtcc tgaacagttg gactgatcag gacagcaaag acagcaccta cagcatgagc
 601 agcaccctca cgttgaccaa ggacgagtat gaacgacata acagctatac ctgtgaggcc
 661 actcacaaga catcaacttc acccattgac aagagcttca acaggaatga gtgttag

(12) Seqüência de Proteína que Define a Seqüência da Cadeia Leve de Extensão Completa de 2F8 (Região Variável Kappa e Região Constante de 2F8) (sem seqüência de sinal) (SEQ ID Nº: 133)

5 1 divltqspas lavslgqrat isckasqsvd ydgnsyinwy qqkpgqppkv liyvasnles
 61 giparfsgsg sgtdfnlhnh pveeedaaty ycqqsiedpp tfgagtklel kradaaptvs
 121 ifppsseqlt sggasvvcfl nnfypkdivn kwkidgserq ngvlnswtdq dskdstysms
 181 stlltkdey erhnsytcea thktstspiv ksfnrnec

10 (13) Seqüência de Ácido Nucléico que Codifica a Seqüência da Cadeia Pesada de Extensão Completa de 3B6 (Região Variável da Cadeia Pesada e Região Constante de IgG1 de 3B6) (seqüência de sinal sublinhada) (SEQ ID Nº: 134)

 1 atggaatggc ctgtatctt tctctcctc ctgtcagtaa ctgaaggtgt ccactccag
 61 gttcagctgc agcagctctgg ggctgaactg gtgaggcctg ggtcctcagt gaagatttcc
 121 tgcaaggctt ctggctatgt attcagtagc tactggatga actgggtgaa gcagaggcct
 15 181 ggacagggtc ttgagtggat tggacagatt tatcctggag atggtgatag taactacaat
 241 ggaaacttca agggtaaagc cacactgact gcagacaaat cctccagtac agcctacatg
 301 cagctcagca gcctaacatc tgaggactct gcggtctatt tctgtgcatc ccagctcggg
 361 ctacgtgaga actacttga ctactggggc caaggcacca ctctcacagt ctctcagcc
 421 aaaacgacac ccccatctgt ctatccactg gcccttggat ctgctgccca aactaactcc
 20 481 atggtgacc tggtatgctt ggtaacgggc tatttccctg agccagtac agtgacctgg
 541 aactctggat ccctgtccag cgggtgtgac accttccag ctgtcctgca gtctgacctc
 601 tacactctga gcagctcagt gactgtcccc tccagcacct ggcccagcga gaccgtcacc
 661 tgcaacgttg cccaccggc cagcagcacc aaggtggaca agaaaattg gccagggat
 721 tgtggtgta agccttgc atgtacagtc ccagaagat catctgtctt catcttccc
 25 781 ccaaagccca aggatgtgct caccattact ctgactccta aggtcacgtg tgtgtggta
 841 gacatcagca aggatgatcc cgaggctcag ttcagctggt ttgtagatga tgtggaggtg
 901 cacacagctc agacgcaacc ccgggaggag cagttcaaca gcacttccg ctcagtcagt
 961 gaacttcca tcatgcacca ggactggctc aatggcaagg agttcaaatg cagggtcaac
 1021 agtcagctt tcctgtccc catcgagaaa accatctcca aaaccaaagg cagaccgaag
 30 1081 gtccacagg tgtacacat tccactccc aaggagcaga tggccaagga taaagtcagt
 1141 ctgacctgca tgataacaga ctcttccct gaagacatta ctgtggagtg gcagtggaat
 1201 gggcagccag cggagaacta caagaacact cagccatca tggacacaga tggctcttac

1261 ttcgtctaca gcaagctcaa tgtgcagaag agcaactggg aggcaggaaa tactttcacc
 1321 tgctctgtgt tacatgaggg cctgcacaac caccatactg agaagagcct ctcccactct
 1381 cctggtaaat ga

5 (14) Seqüência de Proteína que Define a Seqüência da Cadeia Pesada de Extensão Completa de 3B6 (Região Variável da Cadeia Pesada e Região Constante de IgG1 de 3B6) (sem seqüência de sinal) (SEQ ID Nº: 135)

1 qvqlqqsgae lvrpgssvki sckasgyvfs sywmnwwkqr pgqglewigq iypgdgdsny
 61 ngnfkgkatl tadsksstay mqlssltted savyfcasql glrenyfdyw gqgttlvss
 121 aktppsvyp lapgsaaqtn smvtlgclvk gyfpepvtvt wnsqslsgv htfpavlqsd
 10 181 lytlsssvtv psstwpsetv tcnvahpass tkvdkkivpr dgcckpcict vpevssvfif
 241 pppkdvlti tlpkvctcv vdiskddpev qfswfvddve vhtaqtqpre eqfnstfrsv
 301 selpimhqdw lngkefkcrv nsaafpapie ktisktkgrp kapqvytipp pkeqmakdkv
 361 sltcmidff peditvewqw ngqpaenykn tqpimtdgs yfvysklnvq ksnweagntf
 421 tcsvlheglh nhhtekslsh spgk

15 (15) Seqüência de Ácido Nucléico que Codifica a Seqüência da Cadeia Leve de Extensão Completa de 3B6 (Região Variável Kappa e Região Constante de 3B6) (seqüência de sinal sublinhada) (SEQ ID Nº: 136)

1 ATGgacATGa ggaccctgc tcagtttctt ggaatctgt tqctctggtt tccaggtatc
 61 aaatgtgaca tcaagatgac ccagctcca tcttcatgt atgcatctct aggagagaga
 20 121 gtcacaatca ctgcaaggc gagtcaggac attaaaagct attaaagctg gttccagcag
 181 aaaccagga aatctcctaa gaccctgatc tatcgtgtaa acagattggt agatggggtc
 241 ccatcaaggt tcagtggcag tggatctggg caagattctt ctctacccat caccagcctg
 301 gagaatgaag atatgggaat ttattattgt ctacagtatg atgagttcc gttcacgttc
 361 ggagggggga ccaagctgga aataaagcgg gctgatgctg caccaactgt atccatcttc
 25 421 ccaccatcca gtgagcagtt aacatctgga ggtgcctcag tcgtgtgctt ctgaacaac
 481 ttctaccca aagacatcaa tgtcaagtgg aagattgatg gcagtgaacg acaaaatggc
 541 gtctgaaca gttggactga tcaggacagc aaagacagca cctacagcat gagcagcacc
 601 ctacagttga ccaaggacga gtatgaacga cataacagct atacctgtga ggccactcac
 661 aagacatcaa cttcaccat tgtcaagagc ttcaacagga atgagtgtta g

(16) Seqüência de Proteína que Define a Seqüência da Cadeia Leve de Extensão Completa de 3B6 (Região Variável Kappa e Região Constante de 3B6) (sem seqüência de sinal) (SEQ ID Nº: 137)

1 dikmtqspss myaslgervt itckasqdik sylswfqqkp gkspktliyr vnrlvdgvps
 5 61 rfsgsgsgqd ssltitslen edmgiiyclq ydefpftfgg gtleikrad aaptvsifpp
 121 sseqltsgga svvcflnnfy pkdinvkwki dgserqngvl nswtdqdskd stysmsstlt
 181 ltkdeyerhn sytceathkt stspivksfn rnec

(17) Seqüência de Ácido Nucléico que Codifica a Seqüência da Cadeia Pesada de Extensão Completa de 3D11 (Região Variável da Cadeia Pesada e Região Constante de IgG1 de 3D11) (seqüência de sinal sublinhada) (SEQ ID Nº: 138)

1 atggctgtcc cggctgctgt cctctgcctg gttgcattc caagctgtgt cctgtcccag
 61 gtacagctga aggagtcagg acctggcctg gtggcgcct cacagagcct gtccatcact
 121 tgcactgtct ctgggttttc attaaccagc tatagtttac actgggttcg ccagcctcca
 15 181 ggaaagggtc tggaatggct gggagtaata tgggctggtg gaaacacaaa ttataattcg
 241 tctctcatgt ccagactgac catcaggaaa gacaactcca agagccaagt ttcttaaaa
 301 atgaacagtc tgcaaactga tgacacagcc atgtactact gtgccagaga gaggtttgc
 361 tactggggcc aagggactct ggtcactgtc tctgcagcca aaacgacacc cccatctgtc
 421 tatccactgg cccctggatc tgctgccaa actaactcca tggtgaccct gggatgcctg
 20 481 gtcaagggtc attccctga gccagtgaca gtgacctgga actctggatc cctgtccagc
 541 ggtgtgcaca ccttcccagc tgtcctgcag tctgacctct aactctgag cagctcagtg
 601 actgtcccct ccagcacctg gccagcagag accgtcacct gcaacgttgc ccaccggcc
 661 agcagcacca aggtggacaa gaaattgtg cccagggatt gtggtgtaa gccttgcata
 721 tgtacagtcc cagaagtatc atctgtcttc atcttcccc caagcccaa ggatgtgctc
 25 781 accattactc tgactcctaa ggtcacgtgt gttgtgtag acatcagcaa ggatgatccc
 841 gaggccagt tcagctggtt ttagatgat gtggaggtgc acacagctca gacgcaaccc
 901 cgggaggagc agtcaacag cactttccgc tcagtcagtg aacttccat catgcaccag
 961 gactggctca atggcaagga gtcaaatgc agggtaaca gtgcagcttt ccctgcccc
 1021 atcgagaaaa ccatctcaa aaccaaaggc agaccgaagg ctccacaggt gtacaccatt
 30 1081 ccacctcca aggagcagat ggccaaggat aaagtacgtc tgacctgcat gataacagac
 1141 ttctccctg aagacattac tgtggagtgg cagtggaatg ggcagccagc ggagaactac
 1201 aagaacactc agcccatcat ggacacagat ggctcttact tcgtctacag caagctcaat

1261 gtgcagaaga gcaactggga ggcaggaaat actttcacct gctctgtgtt acatgagggc

1321 ctgcacaacc accatactga gaagagcctc tccactctc ctggtaatg a

(18) Seqüência de Proteína que Define a Seqüência da Cadeia Pesada de Extensão Completa de 3D11 (Região Variável da Cadeia Pesada e Região

5 Constante de IgG1 de 3D11) (sem seqüência de sinal) (SEQ ID Nº: 139)

1 qvqlkesgpg lvapsqslsi tctvsgfsit syslhwvrrp pgkglewlgv iwaggnnyn

61 sslmsrltir kdnsksqvl kmnslqtdt amyycarerf aywgqgtlvt vsaaktpps

121 vyplapgsaa qtnsmvtlgc lvkgyfpepv tvtwngsls sgvhtfpavl qsdlytlsss

181 vtvpstwpv etvtcnvahp asstkvdkki vprdcgckpc ictvpevssv fifppkpkdv

10 241 litltpkvt cvvdiskdd pevqfswfvd ddevhtaqtq preeqfnstf rsvselpimh

301 qdwingkefk crvnsaafpa piektisktk grpkapqvvt ippkqemak dkvsltcmi

361 dffpeditve wqwnqpaen ykntqpimdt dgsyfvyski nvqksnweag ntftcvlhe

421 glhnhhteks lshspgk

(19) Seqüência de Ácido Nucléico que Codifica a Seqüência da Cadeia Leve de Extensão Completa de 3D11 (Região Variável Kappa e Região Constante de 3D11) (seqüência de sinal sublinhada) (SEQ ID Nº: 140)

15

1 atggatttc aagtgcagat ttcaqcttc ctgctaataca qtgcctcagt caaaatatcc

61 agaggacaaa ttgtctcac ccagctcca gcaatcatgt ctgcatatcc aggggagaag

121 gtcacatga cctgcagtgc cagctcaagt gtaagtaca tgactggta ccagcagaag

20 181 tcaggcacct ccccaaaag atggatttat gacacatcca aactggcttc tggagtccct

241 gctcgctca gtggcagtg gtctgggacc tcttactccc tcacaatcag tagtatggag

301 gctgaagatg ctgccactta ttactgccag cagtggagta gtaaccact cacgttcggt

361 gctgggacca agctggagct gaaacgggct gatgctgcac caactgtatc catctccca

421 ccatccagtg agcagtaac atctggaggt gcctcagtcg tgtgcttctt gaacaacttc

25 481 taccocaaag acatcaatgt caagtgaag attgatggca gtgaacgaca aaatggcgtc

541 ctgaacagt ggactgatca ggacagcaaa gacagcacct acagcatgag cagcacctc

601 acgttgacca aggacgagta tgaacgacat aacagctata cctgtgaggc cactcacaag

661 acatcaact caccattgt caagagcttc aacaggaatg agtgtag

30 (20) Seqüência de Proteína que Define a Seqüência da Cadeia Leve de Extensão Completa de 3D11 (Região Variável Kappa e Região Constante de 3D11) (sem seqüência de sinal) (SEQ ID Nº: 141)

1 qivltqspai msaypgekv mtcsasssvs ymhwyqqksg tspkrwydt sklasgpar

61 fsgsgsgtsy sltissmeae daatyycqpw ssnpltfag tklelkrada aptvsifpps
 121 seqltsggas vvcflnnfyp kdinvkwkid gserqngvln swtdqdsks tysmsstl
 181 tkdeyerhns ytceathkts tspivksfnr nec

5 (21) Seqüência de Ácido Nucléico que Codifica a Seqüência da Cadeia Pe-
sada de Extensão Completa de 1D3 (Região Variável da Cadeia Pesada e
Região Constante de IgG1 de 1D3) (seqüência de sinal sublinhada) (SEQ ID
 Nº: 142)

1 atgaactttg ggctcagatt gatttcctt gtcctgttt taaaagggtg gaagtgtgaa
 61 gtgcagctgg tggagtctgg gggaggctta gtgcagcctg gagggtccct gaaactctcc
 10 121 tgtgcagcct ctggattcac ttcagtgac tattacatgt ctggggtcgc ccagactcca
 181 gagaagaggc tggagtgggt cgcatacatt agtagtggtg gtggtagcac ctactatcca
 241 gacagtgta agggctgatt caccatctcc cgagacaatg ccaagaacac cctgtacctg
 301 caaatgagca gtctgaagtc tgaggacaca gccatatatt actgtgtgag acaaggggat
 361 ggttattacg gggactatgc tatggactac tggggtcaag gaacctcagt catcgtctcc
 15 421 tcagccaaaa cgacaccccc atctgtctat ccaactggccc ctggatctgc tgcccaaact
 481 aactccatgg tgaccctggg atgcctggtc aagggctatt tccctgagcc agtgacagtg
 541 acctggaact ctggatccct gtccagcggg gtgcacacct tccagctgt cctgcagctc
 601 gacctctaca ctctgagcag ctcagtgact gtcccctcca gcacctggcc cagcgagacc
 661 gtcacctgca acgtgcccc cccggccagc agcaccaagg tggacaagaa aattgtgccc
 20 721 agggattgtg gttgaagcc ttgcatatgt acagtcccag aagtatcatc tgtctcatc
 781 ttcccccaa agccaagga tgtgtcacc attactctga ctctaaggt cacgtgtgtt
 841 gtggtagaca tcagcaagga tgatcccag gtccagtca gctggtttgt agatgatgtg
 901 gagggtcaca cagctcagac gcaaccccgg gaggagcagt tcaacagcac ttccgctca
 961 gtcagtgaac ttccatcat gcaccaggac tggctcaatg gcaaggagt caaatgcagg
 25 1021 gtcaacagtg cagcttccc tgccccatc gagaaaacca tctccaaaac caaaggcaga
 1081 ccgaaggctc cacaggtgta caccattcca cctccaagg agcagatggc caaggataaa
 1141 gtcagtctga cctgcatgat aacagacttc ttccctgaag acattactgt ggagtggcag
 1201 tggaatgggc agccagcggg gaactacaag aacactcagc ccatcatgga cacagatggc
 1261 tcttactcgc tctacagaa gctcaatgtg cagaagagca actgggaggc aggaaatact
 30 1321 ttcacctgct ctgtgttaca tgagggcctg cacaaccacc atactgagaa gaggctctcc
 1381 cactctctg gtaaatga

(22) Seqüência de Proteína que Define a Seqüência da Cadeia Pesada de Extensão Completa de 1D3 (Região Variável da Cadeia Pesada e Região Constante de IgG1 de 1D3) (sem seqüência de sinal) (SEQ ID Nº: 143)

1 evqlvesggg lvqpggskl scaasgffs dyymswvrqt pekrlwvay issgggsty
 5 61 pdsvkgrfti srdnakntly lqmsslksed taiyycvrqg dgyygdyamd ywgqgtsviv
 121 ssaktppsv yplapgsaaq tnsmtlgcl vkgyfpepvt vtwnsgslss gvhtfpavlq
 181 sdlytlsssv tvpsstwpse tvtcnvahpa sstkvdkkiv prdcgckpci ctvpevssvf
 241 ifppkpkdvl titltpkvtc vvdiskddp evqfswfvdd vevhtaqtqp reeqfnstfr
 301 svselpimhq dwlngkefkc rvnsaafpap iektisktkg rpkapqvyti pppkeqmakd
 10 361 kvsltcmid ffpeditvew qwnqpaeny kntqimtdt gsyfvyskln vqksnweagn
 421 tftcsvlheg lnhhhteksl shspgk

(23) Seqüência de Ácido Nucléico que Codifica a Seqüência da Cadeia Leve de Extensão Completa de 1D3 (Região Variável Kappa e Região Constante de 1D3) (seqüência de sinal sublinhada) (SEQ ID Nº: 144)

15 1 atgagtgtgc ccaactcaggt cctgaggttg ctgctgctgt ggcttacaga tgtcagatgt
 61 gacatccaga tgactcagtc tccagcctcc ctatctgtat ctgtgggaga aactgtcacc
 121 atcacatgtc gaacaagtga gaatatttac agtaatttag cgtggtatca gcagaaacag
 181 ggaaaatctc ctgagctcct aatctatgct gcaacaaact tagcagatgg tgtgcatca
 241 aggttcagtg gcagtgatc aggcacacag tttccctca ggatcaacag cctgcagtct
 20 301 gaagatttg ggaggtatta ctgcaacat tttggggga ctccgtacac gttcggaggg
 361 gggaccaaac tggaaataaa acgggctgat gctgcaccaa ctgtatccat ctcccacca
 421 tccagtgagc agttaacatc tggaggtgcc tcagtcgtgt gcttctttaa caacttctac
 481 cccaagaca tcaatgtcaa gtggaagatt gatggcagtg aacgacaaaa tggcgtcctg
 541 aacagttgga ctgatcagga cagcaaagac agcacctaca gcatgagcag caccctcag
 25 601 ttgaccaagg acgagtatga acgacataac agctatacct gtgaggccac tcacaagaca
 661 tcaacttcac ccattgtcaa gagcttcaac aggaatgagt gttag

(24) Seqüência de Proteína que Define a Seqüência da Cadeia Leve de Extensão Completa de 1D3 (Região Variável Kappa e Região Constante de 1D3) (sem seqüência de sinal) (SEQ ID Nº: 145)

30 1 diqmtqspas lsvsvgetvt itcrtseniy snlawyqqkq gkspqlliya atnladgvps
 61 rfsqsgsgtq fslrinslqs edfgryycqh fwgtpyftgg gtleikrad aaptvsifpp
 121 sseqiltsgga svvcflnnfy pkdinvwki dgserqngvl nswtdqdskd stysmsstt

181 Itkdeyerhn sytceathkt stspivksfn r nec

(25) Seqüência de Ácido Nucléico que Codifica a Seqüência da Cadeia Pesada de Extensão Completa de 1F3 (Região Variável da Cadeia Pesada e Região Constante de IgG1 de 1F3) (seqüência de sinal sublinhada) (SEQ ID

5 N°: 146)

1 atgaacttg ggctcagatt gatttcctt gtcctgttt taaaagggtg gaagtgtgag
61 gtcagctgg tggagtctgg gggaggctta gtcagctcg gagggtccct gaaactctcc
121 tgtcggcct ctggattcac ttcagtaac tattcatgt ctgggttcg ccagactcca
181 gagaagaggc tggagtgggt cgatatatt agtagtggtg gtggtagcac ctactatcca
10 241 gacagtgtga agggctgatt caccatctct agagacaatg ccaagaacac cctgtacctg
301 caaatgagca gctgaagtc tgaggacaca gccatgtatt actgtgtaag acaaggggat
361 ggttactacg gggactatgc tatggactac tgggtcaag gaacctcagt caccgtctcc
421 tcagccaaaa cgacaccccc atctgtctat cactggccc ctggatctgc tgcccaaact
481 aactccatgg tgacctggg atgcctggtc aagggtatt tccctgagcc agtgacagt
15 541 acctggaact ctggatccct gtccagcggg gtcacacct tcccagctgt cctgcagtct
601 gaccttaca ctctgagcag ctcagtgact gtcccctcca gcacctggcc cagcgagacc
661 gtcacctgca acgttgcca cccggccagc agcaccaagg tggacaagaa aattgtgccc
721 agggattgtg gttgaagcc ttgcatatgt acagtcccag aagtatcatc tgtctcatc
781 ttcccccaa agccaagga tgtgctcacc attactctga ctctaaggt cacgtgtgt
20 841 gtggtagaca tcagcaagga tgatcccag gtccagtca gctggttgt agatgatgtg
901 gaggtgcaca cagctcagac gcaaccccg gaggagcagt tcaacagcac ttccgctca
961 gtcagtgaac ttccatcat gcaccaggac tggctcaatg gcaaggagt caaatgcagg
1021 gtcaacagtg cagcttccc tgccccatc gagaaaacca tctccaaaac caaaggcaga
1081 ccgaaggctc cacaggtgta caccattcca cctcccaagg agcagatggc caaggataaa
25 1141 gtcagtctga cctgcatgat aacagacttc ttccctgaag acattactgt ggagtggcag
1201 tggaatgggc agccagcggg gaactacaag aacctcagc ccatcatgga cacagatggc
1261 tcttactcg tctacagcaa gctcaatgtg cagaagagca actgggaggc aggaaatact
1321 ttacctgct ctgtgtaca tgagggctg cacaaccacc atactgagaa gagcctctcc
1381 cactctctg gtaaatga

(26) Seqüência de Proteína que Define a Seqüência da Cadeia Pesada de Extensão Completa de 1F3 (Região Variável da Cadeia Pesada e Região Constante de IgG1 de 1F3) (sem seqüência de sinal) (SEQ ID Nº: 147)

1 evqlvesggg lvqsggslkl scaasgftfs nyfmswvrrt pekrlwvay issgggstyy
 5 61 pdsvkgrfti srdnakntly lqmsslkسد tamyycvrrqg dgyygydamd ywgqgtsvtv
 121 ssaktppsv yplapgsaaq tnsmtlgl vkgyfpepvt vtwnsgslss gvhtfpavlq
 181 sdlytlsssv tpsstwpse tvtrnvahpa sstkvdkkiv prdcgckpci ctvpevssvf
 241 ifppkpkdvl titltpkvtc vvdiskddp evqfswfvdd vevhtaqtqp reeqfnstfr
 301 svselfpimhq dwlngkefkc rvnsaafpap iektisktkg rpkapqvyti pppkeqmakd
 10 361 kvsltcmid fpeditvew qwnqpaeny kntqpimtd gsyfvyskln vqksnweagn
 421 tftcsvlheg lnhhteksl shspgk

(27) Seqüência de Ácido Nucléico que Codifica a Seqüência da Cadeia Leve de Extensão Completa de 1F3 (Região Variável Kappa e Região Constante de 1F3) (seqüência de sinal sublinhada) (SEQ ID Nº: 148)

15 1 atgaagtgtgc ccactcaggt cctgggggtg ctactgctgt ggcttacaga tgccagatgt
 61 gacatccaga tgactcagtc tccagcctcc ctatctgtat ctgtgggaga aactgtcacc
 121 atcacatgtc gagcaagtga gaatatttac agtaatttag catggatca gcagaaacag
 181 ggaaaatctc ctcagctcct ggtctatgat gcaacacact taccagatgg tgtgccatca
 241 aggtcagtg gcagtgatc aggcacacag tttccctca agatcaacag cctgcagtct
 20 301 gaagatttg ggagtatta ctgtcaacat tttggggta ctccgtacac gtttggaggg
 361 gggaccagac tggaaattaa acgggctgat gctgcaccaa ctgtatccat ctcccacca
 421 tccagtgagc agttaacatc tggaggtgcc tcagtcgtgt gcttctgaa caactctac
 481 cccaaagaca tcaatgtcaa gtggaagatt gatggcagtg aacgacaaaa tggcgtcctg
 541 aacagttgga ctgatcagga cagcaaagac agcacctaca gcatgagcag caccctcagc
 25 601 tgaccaagg acgagtatga acgacataac agctatacct gtgaggccac tcacaagaca
 661 tcaactcac ccattgtcaa gagcttcaac aggaatgagt gtag (28)

Seqüência de Proteína que Define a Seqüência da Cadeia Leve de Extensão Completa de 1F3 (Região Variável Kappa e Região Constante de 1F3) (sem seqüência de sinal) (SEQ ID Nº: 149)

30 1 diqmtqspas lsvsvgetvt itcraseny snlawyqqkq gkspqllvyd athlpdgvps
 61 rfsqsgsgtq fslkinslqs edfgyycqh fwtgpytfgg gtrleikrad aaptvsifpp
 121 sseqitsgga svvcflnnfy pkdinvkwki dgserqngvl nswtdqskd stysmsstlt

181 ltkdeyerhn sytceathkt stspivksfn nec

(29) Seqüência de Ácido Nucléico que Codifica a Seqüência da Cadeia Pesada de Extensão Completa de 3A12 (Região Variável da Cadeia Pesada e Região Constante de IgG1 de 3A12) (seqüência de sinal sublinhada) (SEQ

5 ID Nº: 150)

1 atgaacttg ggctcagatt gatttcctt gtcctgttt taaaagggtg qaagtgtgaa
61 gtgcagctgg tggagtctgg gggaggctta gtgcagcctg gagggtcct gaaaatctcc
121 tgtgcagcct ctggatttac ttcagtaac tatttcattg ctggggtcg ccagactcca
181 gagaagaggc tggagtgggt cgcatacatt agtagtggtg gtggtagcac ctactatcca
10 241 gacagtgtga agggctgatt caccatctcc agagacaatg ccaagaacac cctgtacctg
301 caaatgaaca gtctgaagtc tgaggacaca gccatgtatt actgtgtaag acaaggagat
361 ggftactatg gggactatgc tatggactac tgggtcaag gaacctcagt caccgtctcc
421 tcagcaaaaa cgacaccccc atctgtctat ccaactggccc ctggatctgc tgccaaaact
481 aactccatgg tgacctggg atgcctggc aagggtatt tccctgagcc agtgacagt
15 541 acctggaact ctggatccct gtccagcggg gtgcacacct tcccagctgt cctgcagtct
601 gacctctaca ctctgagcag ctcagtgact gtcccctcca gcacctggcc cagcgagacc
661 gtcacctgca acgttgccca cccggccagc agcaccaagg tggacaagaa aattgtgccc
721 agggattgtg gttgtaagcc ttgcatatgt acagtcccag aagtatcatc tgtctcatc
781 ttcccccaa agcccaagga tgtgctcacc attactctga ctctaaggt cactgtgtt
20 841 gtgtagaca tcagcaagga tgatcccag gtccagtca gctggttgt agatgatgt
901 gaggtagaca cagctcagac gcaaccccgg gaggagcagt tcaacagcac ttccgctca
961 gtcagtgaac ttccatcat gcaccaggac tggctcaatg gcaaggagt caaatgcagg
1021 gtcaacagtg cagcttccc tgccccatc gagaaaacca tccaaaac caaaggcaga
1081 ccgaaggctc cacaggtgta caccattcca cctcccaagg agcagatggc caaggataaa
25 1141 gtcagtctga cctgatgat aacagacttc tccctgaag acattactgt ggagtggcag
1201 tggatggg agccagcggg gaactacaag aacctcagc ccatcatgga cacagatggc
1261 tcttactctg tctacagcaa gctcaatgtg cagaagagca actgggaggc aggaaatct
1321 ttacactgct ctgtgttaca tgagggcctg cacaaccacc atactgagaa gagcctctcc
1381 cactctctg gtaaatga

(30) Seqüência de Proteína que Define a Seqüência da Cadeia Pesada de Extensão Completa de 3A12 (Região Variável da Cadeia Pesada e Região Constante de IgG1 de 3A12) (sem seqüência de sinal) (SEQ ID Nº: 151)

1 evqlvesggg lvqpggslki scaasgftfs nyfmswvrqt pekrlwvay issgggstyy
 5 61 pdsvkgrfti srdnakntly lqmnslksed tamyycvrqg dgyygyamd ywgqgtsvtv
 121 ssaktppsv yplapgsaaq tnsmtlglcl vkgyfpepvt vtwnsgslss gvhtfpavliq
 181 sdlytlsssv tvpsstwpse tvtcnvahpa sstkvdkkiv prdcgckpci ctvpevssvf
 241 ifppkpkdvl titltpkvtc vvdiskddp evqfswfvdd vevhtaqtqp reeqfnstfr
 301 svselfpimhq dwlngkefkc rvnsaafpap iektisktkg rpkapqvtyi pppkeqmakd
 10 361 kvsltcmid fpeditvew qwnqpaeny kntqpimtd gsyfvyskin vqksnweagn
 421 ftcsvlheg lnhhhteksl shspgk

(31) Seqüência de Ácido Nucléico que Codifica a Seqüência da Cadeia Leve de Extensão Completa de 3A12 (Região Variável Kappa e Região Constante de 3A12) (seqüência de sinal sublinhada) (SEQ ID Nº: 152)

15 1 atgagtgtgc ccactcaggt cctgggggtg ctgctgctgt gccttacaga tgccagatgt
 61 gacatccaga tgactcagtc gccagcctcc ctatctgtat ctgtgggaga aactgtcacc
 121 atcacatgtc gagcaagtga gaatatttac attaatttag catggtatca gcagaaacag
 181 ggaaaatctc ctgagctcct ggtccatgct gcaacaaagt tagcagatgg tgtgccatca
 241 aggttcagtg gcagtgatc aggcacacag tattccctca agatcaacag cctgcagtct
 20 301 gaagatttg ggagttatta ctgtcaacat tttggggta ctccgtacac gtcggagggg
 361 gggaccaaac tagaaataaa acgggctgat gctgcaccaa ctgtatccat ctcccacca
 421 tccagtgagc agttaacatc tggaggtgcc tcagtcgtgt gcttctgaa caactctac
 481 cccaaagaca tcaatgtcaa gtggaagatt gatggcagtg aacgacaaaa tggcgtcctg
 541 aacagtggga ctgatcagga cagcaaagac agcacctaca gcatgagcag caccctcag
 25 601 tgaccaagg acgagtatga acgacataac agctatacct gtgaggccac tcacaagaca
 661 tcaactcac ccattgtcaa gagcttcaac aggaatgagt gttag

(32) Seqüência de Proteína que Define a Seqüência da Cadeia Leve de Extensão Completa de 3A12 (Região Variável Kappa e Região Constante de 3A12) (sem seqüência de sinal) (SEQ ID Nº: 153)

30 1 diqmtspas lsvsvgetvt itcraseny inlawyqqkq gkspqllvha atkladgvps
 61 rfsgsgsgtq yslkinslqs edfgsyycqh fwgtpytfgg gtleikrad aaptvsifpp
 121 sseqitsgga svvcflnfy pkdinvkwki dgserqngvl nswtdqskd stysmsstlt

181 Itkdeyerhn sytceathkt stspivksfn nec

Por conveniência, a Tabela 2 fornece um quadro de concordância que mostra a correspondência entre as seqüências de extensão completa dos anticorpos discutidos neste Exemplo com aqueles apresentados na

5 Listagem de Seqüência.

TABELA 2

SEQ. ID Nº	Proteína ou Ácido Nucléico
122	Variável + constante de IgG1 Pesada de 1A3 – ácido nucléico
123	Variável + constante de IgG1 Pesada de 1A3 – proteína
124	Variável Leve + constante de 1A3 – ácido nucléico
125	Variável Leve + constante de 1A3 – proteína
126	Variável + constante de IgG1 Pesada de 2B8 – ácido nucléico
127	Variável + constante de IgG1 Pesada de 2B8 – proteína
128	Variável + constante Leve de 2B8 – ácido nucléico
129	Variável + constante Leve de 2B8 – proteína
130	Variável + constante de IgG1 Pesada de 2F8 – ácido nucléico
131	Variável + constante de IgG1 Pesada de 2F8 – proteína
132	Variável + constante Leve de 2F8 – ácido nucléico
133	Variável + constante Leve de 2F8 – proteína
134	Variável + constante de IgG1 Pesada de 3B6 – ácido nucléico
135	Variável + constante de IgG1 Pesada de 3B6 – proteína
136	Variável + constante Leve de 3B6 – ácido nucléico
137	Variável + constante Leve de 3B6 – proteína
138	Variável + constante de IgG1 Pesada de 3D11 – ácido nucléico
139	Variável + constante de IgG1 Pesada de 3D11 – proteína
140	Variável + constante Leve de 3D11 – ácido nucléico
141	Variável + constante Leve de 3D11 – proteína
142	Variável + constante de IgG1 Pesada de 1D3 – ácido nucléico
143	Variável + constante de IgG1 Pesada de 1D3 – proteína
144	Variável + constante Leve de 1D3 – ácido nucléico
145	Variável + constante Leve de 1D3 – proteína

SEQ. ID Nº	Proteína ou Ácido Nucléico
146	Variável + constante de IgG1 Pesada de 1F3 – ácido nucléico
147	Variável + constante de IgG1 Pesada de 1F3 – proteína
148	Variável + constante Leve de 1F3 – ácido nucléico
149	Variável + constante Leve de 1F3 – proteína
150	Variável + constante de IgG1 Pesada de 3A12 – ácido nucléico
151	Variável + constante de IgG1 Pesada de 3A12 – proteína
152	Variável + constante Leve de 3A12 – ácido nucléico
153	Variável + constante Leve de 3A12 – proteína

Exemplo 3 – Produção de Várias Proteínas hHGF Recombinantes

Este Exemplo descreve a clonagem e expressão de várias proteínas recombinantes usadas para caracterizar os anticorpos criados no Exemplo 1 e no Exemplo 14. Em particular, este Exemplo descreve a clonagem e expressão da proteína hHGF recombinante, uma proteína hHGF recombinante que contém uma substituição de glicina para glutamato na posição 555 (G555E), uma proteína hHGF recombinante que contém uma substituição de cisteína para arginina na posição 561 (C561R), uma proteína HGF quimérica camundongo-humano-camundongo (mhm) recombinante contendo a seqüência de HGF V495-L585 humana disposta dentro da seqüência de HGF de camundongo, uma proteína de HGF quimérica mhm recombinante contendo a seqüência de HGF I499-R566 humana disposta dentro da seqüência de HGF de camundongo, e uma proteína de HGF quimérica mhm recombinante contendo a seqüência de HGF W507-L585 humana disposta dentro da seqüência de HGF de camundongo.

Os seguintes construtos de expressão foram gerados usando técnicas moleculares usuais e as seqüências de cDNA resultantes foram confirmadas por seqüenciamento de DNA:

a. hHGF-Fc

Em um primeiro ciclo de PCR, dois fragmentos de PCR sobreponíveis foram gerados introduzindo um sítio de Not I e codificando um sinalizador 6xHis entre hHGF e hIgFc. Os fragmentos de PCR sobreponíveis serviram como molde em um segundo ciclo para amplificar hHGF-his-IgFc.

O fragmento resultante foi digerido por NheI e BamHI e clonado em pcDNA5/FRT (Invitrogen, #35-3014). Então, hHGF foi amplificado a partir do clone ID: IOH29794 (cDNA de HGF humano) da Invitrogen. A seqüência correspondeu à seqüência depositada no NCBI sob o número de acesso

5 NM_000601.4.

(1) Iniciador de NheI de hHGF5'

ACTGGCTAGCATGTGGGTGACCAAACCTCCT (SEQ ID Nº: 102)

(2) Iniciador de His Tag de NotI hHGF 3'

GTGATGGTGGTGGTGGTGGCGGCCGCATGACTGTGGTACCTTAT

10 ATG (SEQ ID Nº: 103)

(3) Iniciador de HisIgFc 5'

ACTGGCGGCCGCCATCACCATCACCATCAC (SEQ ID Nº: 104)

(4) Iniciador de BamHI de IgFc 3'

ACTGGGATCCTCACTATTTACCCGGGGACAG (SEQ ID Nº: 105)

15 b. G555E de hHGF-Fc e C561R de hHGF-Fc

Os mutantes de hHGF-Fc, G555E e C561R, foram gerados por mutagênese sítio-dirigida usando o kit de mutagênese sítio-dirigida Quik-Change II XL (Stratagene) de acordo com as instruções do fabricante.

(1) Iniciador senso de hHGF-Fc (G555E)

20 CATGATGTCCACGAAAGAGGAGATGAG (SEQ ID Nº: 106)

(2) Iniciador anti-senso de hHGF-Fc (G555E)

CTCATCTCCTCTTTTCGTGGACATCATG (SEQ ID Nº: 107)

(3) Iniciador senso de hHGF-Fc (C561R)

GGAAGAGGAGATGAGAAACGCAAACAGGTTCTCAATG (SEQ ID Nº: 108)

25 (4) Iniciador anti-senso de hHGF-Fc (C561R)

CATTGAGAACCTGTTTTCGTTTCTCATCTCCTCTTCC (SEQ ID Nº: 109)

c. Fc quimérico camundogno-humano-camundongo

O construto de IgFc quimérico camundongo-humano-camundongo contém uma cadeia-alfa de mHGF, aminoácidos da cadeia β

30 Val 495-Leu 585 de HGF humano, e a cadeia beta C-terminal de mHGF seguido por sinalizador 6xHis e IgG-Fc.

cDNA de HGF humano que codifica os aminoácidos V495-L585

foi amplificado a partir do clone ID: IOH29794 (cDNA de HGF humano) da Invitrogen. A seqüência corresponde à seqüência depositada no NCBI sob o número de acesso NM_000601.4. Seqüências de HGF de camundongo foram amplificadas por RT-PCR a partir de RNA total de fígado de camundongo (Clontech, # 636603) usando o kit de RT-PCR Super Script One Step da Invitrogen (#10928-034) de acordo com as instruções do fabricante. A seqüência de cDNA de mHGF corresponde à seqüência depositada no NCBI sob o número de acesso D10213.1.

Três fragmentos, referidos como 1, 2 e 3 foram gerados usando iniciadores de PCR sobreponíveis e anelados em ciclos consecutivos de amplificação por PCR. O produto final foi clivado com NheI e NotI e clonado em pcDNA5/FRT IgGFc.

(1) Iniciadores do fragmento 1 para NheI 5' da cadeia alfa de mHGF

5' ATCGGCTAGCATGATGTGGGGGACCAAAC (SEQ ID Nº: 110)
 3' GAATCCCATTTACAACCCGCAGTTGTTTTGTTTTGG (SEQ ID Nº: 111)

(2) Iniciadores do fragmento 2 para aa V495-L585 da cadeia alfa de hHGF

5' CCAAACAAAACAACACTGCGGGTTGTAATGGGATTC (SEQ ID Nº: 112)
 3' CAGGATTGCAGGTCGAGCAAGCTTCATTAACAGATCT (SEQ ID Nº: 113)

(3) Iniciadores do fragmento 3 para NotI 3' C-terminal da cadeia beta de mHGF

5' AGATCTGGTTTTAATGAAGCTTGCTCGACCTGCAATCCTG (SEQ ID Nº: 114)
 3' GTAATTTTGACATACAAGTTGTGCGGCCGCCATCACCATCACCATCAC (SEQ ID Nº: 115)

d. Construção de quimeras de hHGF e mhm

Os vetores que codificam as quimeras de hHGF e mhm (V495-L585), pcDNA5/FRT hHGF e quimera pcDNA5/FRT-mhm (V495-L585), sem Fc-tag foram gerados por mutagênese sítio-dirigida. Um códon de parada foi introduzido a 3' de 6xHis usando o kit de mutagênese sítio-dirigida Quik-Change II XL (Stratagene) de acordo com as instruções do fabricante. Os iniciadores da mutagênese incluíram o iniciador 1:

CATCACCATCACCATCACTAAGCGGGTCTGGTGCCACG (SEQ ID Nº: 116), e o Iniciador 2: CGTGGCACCAGACCCGCTTAGTGATGGT-GATGGTGATG (SEQ ID Nº: 117).

Além disso, duas quimeras de mhm adicionais foram criadas a partir do construto de pcDNA5/FRT-mhm (V495-L585) por mutagênese sítio-dirigida usando o kit de mutagênese sítio-dirigida QuikChange II XL (Stratagene) de acordo com as instruções do fabricante. Um construto de mhm continha a região de I499-R556 de hHGF disposta entre as seqüências murinas. O outro construto de mhm continha a região de W507-L585 de hHGF disposta entre as seqüências murinas.

Para a quimera de mhm (I499-R556), as seguintes mutações pontuais foram feitas em ordem no construto molde da quimera pcDNA5/FRT-mhm (V495-L585): D558E, C561R, V564I, V567I e M583L, usando as seqüências de oligonucleotídeo apropriadas. Para a quimera de mhm (W507-L585), as seguintes mutações pontuais foram introduzidas em uma etapa na quimera molde pcDNA5/FRT-mhm (V495-L585): Q502R, N504T e I505V, usando as seqüências de oligonucleotídeo apropriadas.

A seqüência de nucleotídeo resultante da proteína hHGF-Fc é descrita como SEQ ID Nº: 118, incluindo a seqüência de sinal (nucleotídeos 1-93) e pró-domínio (nucleotídeos 94 a 162). A seqüência de aminoácido da proteína hHGF-Fc é descrita como SEQ ID Nº: 119.

A seqüência de nucleotídeo resultante que codifica a proteína mhm (V495-L585)-Fc quimérica é descrita em SEQ ID Nº: 120, incluindo a seqüência de sinal (nucleotídeos 1 a 96) e o pró-domínio (nucleotídeos 97 a 165). A seqüência de aminoácido da proteína quimérica mhm (V495-L585)-Fc é descrita em SEQ ID Nº: 121.

A seqüência de nucleotídeo resultante que codifica e a seqüência de proteína que define o construto de mhm (V495-L585) são descritas em SEQ ID NOS. 211 e 212, respectivamente. A seqüência de ácido nucléico descrita em SEQ ID Nº: 211 inclui a seqüência de sinal (nucleotídeos 1 a 96) e o pró-domínio (nucleotídeos 97 a 165), e a seqüência de proteína descrita em SEQ ID Nº: 212 inclui a seqüência de proteína ativa (sem a seqüên-

cia de sinal ou o pró-domínio). A seqüência de nucleotídeo resultante que codifica e a seqüência de proteína que define o construto de mhm (I499-R556) são descritas em SEQ ID NOS. 213 e 214, respectivamente. A seqüência de ácido nucléico descrita em SEQ ID Nº: 213 inclui a seqüência de sinal (nucleotídeos 1 a 96) e o pró-domínio (nucleotídeos 97-165), e a seqüência de proteína descrita em SEQ ID Nº: 214 inclui a seqüência de proteína ativa (sem a seqüência de sinal ou o pró-domínio). A seqüência de nucleotídeo resultante que codifica e a seqüência de proteína que define mhm (W507-L585) são descritas em SEQ ID NOS. 215 e 216, respectivamente. A seqüência de ácido nucléico descrita em SEQ ID Nº: 215 inclui a seqüência de sinal (nucleotídeos 1 a 96) e o pró-domínio (nucleotídeos 97 a 165), e a seqüência de proteína descrita em SEQ ID Nº: 216 inclui a seqüência de proteína ativa (sem a seqüência de sinal ou o pró-domínio).

e. Expressão de Proteína

15 (1) Cultura celular

Células CHO FlpIn (Invitrogen, Nº de Catálogo R758-07)) foram cultivadas em meio F12K (ATCC, Nº de Catálogo 30-2004), 10% de FCS (Invitrogen, Nº de Catálogo 10438026), 1% de Penicilina (10000 unidades/mL) /estreptomicina (10.000 µg/mL) (Invitrogen, Nº de Catálogo 15140-20 122) a 37°C, 5% de CO₂, 100 µg/mL de Zeocina (Invitrogen, Nº de Catálogo R250-01).

(2) Geração de Linhagens Celulares CHO estáveis

As células hospedeiras CHO FlpIn foram transfectadas com uma proporção 9:1 de DNA de plasmídeo de expressão pOG44:pcDNA5/FRT usando lipofectamina 2000 de acordo com as instruções do fabricante (Invitrogen, Nº de Catálogo 11668-027). Como controles, as células foram transfectadas com o vetor vazio pcDNA5/FRT vetor/pOG44 e plasmídeo pOG44 (Invitrogen, Nº de Catálogo 35-3018) apenas. Vinte e quatro horas após a transfecção, as células foram repicadas, e após quarenta e oito horas 0,5 mg/mL de Higromicina B (Sigma, Nº de Catálogo H0654-SPEC) foi adicionado às células. A seleção policlonal de células estáveis foi realizada em F12K, 10% de FCS, 1% de Penicilina/Estreptomicina, 0,5 mg/mL de Higromicina B.

(3) Expressão de proteína em linhagens celulares CHO FlpIn estáveis

Aproximadamente 2×10^6 células foram semeadas em placas de 15 cm e cultivadas em F12K (ATCC, Nº de Catálogo 30-2004)/DMEM com alto teor de glicose (Invitrogen, Nº de Catálogo 11995065) 1:1, 5% de *ultra low* IgG FCS (Invitrogen, #16250-78) a 37°C, 5% de CO₂ por 5 a 6 dias. Os sobrenadantes foram colhidos e as proteínas resultantes analisadas por E-LISA e por ressonância de plásmon de superfície.

Exemplo 4 – Características de ligação de Anticorpos Monoclonais Anti-hHGF

Os anticorpos monoclonais produzidos no Exemplo 1 foram caracterizados por sua habilidade de se ligar a hHGF, e algumas das proteínas HGF recombinantes produzidas no Exemplo 3.

Os anticorpos foram analisados por ressonância de plásmon de superfície usando um instrumento BIAcore T100 para avaliar sua habilidade de se ligar a HGF e algumas das proteínas de fusão discutidas no Exemplo 3. Cada anticorpo foi imobilizado sobre um chip sensor CM5 de dextran carboxilado (BIAcore, Nº de Catálogo BR-1006-68) por acoplamento de amina (BIAcore, Nº de Catálogo BR-1000-50) usando um protocolo de acoplamento usual de acordo com as instruções do fabricante.

As análises foram realizadas a 25°C usando PBS (GIBCO, Nº de Catálogo 14040-133) contendo 0,05% de tensoativo P20 (BIAcore, Nº de Catálogo R-1000-54), 2 mg/mL de BSA (EMD, Nº de Catálogo 2930) e 10 mg/mL de Sal de Sódio CM-Dextran (Fluka, Nº de Catálogo 86524) como tampão de corrida. Sobrenadantes contendo diferentes proteínas de fusão de HGF ou sobrenadante de células transfectadas com o vetor vazio foram injetados sobre cada anticorpo em uma taxa de fluxo de 30 µL/min por 3 minutos. A ligação resultante foi determinada como unidades de ressonância (RU) sobre o basal 30 segundos após o final da injeção. A ligação foi comparada com HGF humano (R&D Systems, Nº de Catálogo 294-HGN-025) diluído em tampão de corrida. Ligação inespecífica foi monitorada por comparar a ligação a uma superfície de controle onde IgG de camundongo (Rockland, Nº de Catálogo 010-0102) foi imobilizada usando o mesmo procedimento de

acoplamento de amina.

Os resultados estão resumidos na Tabela 3.

TABELA 3

Anticorpo	rhHGF (R&D Systems)	mHGF (R&D Systems)	Quimera de mhm (V495-L585)	HGF humano	G555E	C561R
1A3	Sim	Não	Não	Sim	Sim	Sim
1D3	Sim	Não	Sim	Sim	Sim	Sim
1F3	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim
2B8	Sim	Não	Sim	Sim	Sim	Sim
2F8	Sim	Sim	Não	Sim	Sim	Sim
3A12	Sim	Não	Não	Sim	Sim	Sim
3B6	Sim	Não	Não	Sim	Sim	Sim
3D11	Sim	Não	Não	Sim	Sim	Sim

Os resultados na Tabela 3 demonstram que cada um dos anticorpos se liga a rHGF e HGF humano purificado. Além disso, todos os anticorpos se ligam a hHGF contendo as mutações pontuais G555E e C561R. Em geral, todos os anticorpos exceto 1F3 e 2F8 não se ligam a murino demonstrando que os anticorpos 1A3, 1D3, 2B8, 3A12, 3B6, e 3D11 se ligam especificamente a HGF humano. Os anticorpos 1D3, 1F3, e 2B8 se ligam à quimera de camundongo-humano-camundongo enquanto que os anticorpos restantes não se ligaram. Os resultados sugerem que os anticorpos 1D3 e 2B8 se ligam pelo menos em parte aos resíduos 495 a 585 de HGF humano. Os anticorpos 1A3, 3A12, 3B6, e 3D11 parecem se ligar a porções de hHGF humano com exceção dos resíduos 495 a 585. No momento é não se sabe o motivo de 2F8 não se ligar à quimera de mhm já que ele parece se ligar tanto a hHGF quanto mHGF.

Exemplo 5 – Habilidade dos Anticorpos Monoclonais Anti-hHGF se Ligarem a HGF Reduzido e Não-Reduzido

Neste Exemplo, os anticorpos monoclonais anti-hHGF produzidos no Exemplo 1 foram analisados quanto a sua habilidade de se ligar a HGF reduzido e não reduzido.

A reatividade dos soros anti-HGF com o hHGF recombinante foi

5 avaliada por *immunoblotting*. Oito μg de proteína hHGF recombinante em tampão de corrida NuPAGE MOPS SDS (Invitrogen) com ou sem tampão redutor de amostra NuPAGE (Invitrogen) foram fracionados em um gel de Bis-Tris 4 a 12% com poços de 1,0mm X 2D (Invitrogen, Carlsbad, CA). As proteínas fracionadas foram então transferidas para uma membrana de nitrocelulose usando procedimentos usuais. As membranas de nitrocelulose foram bloqueadas com solução de leite em pó desnatado a 5% em Salina Tamponada com Tris com 0,1% de Tween-20[®] (TBST), e então colocadas em um equipamento Mini Protean II Multi-Screen (BioRad) para bloqueio adicional.

10 As membranas resultantes foram marcadas com os anticorpos purificados em um equipamento Multi-Screen. Os anticorpos purificados foram diluídos para 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ em tampão de bloqueio. A membrana de nitrocelulose foi então removida do equipamento, e incubada com anticorpos anti-IgG de camundongo marcada com peroxidase de rábano silvestre. Os resultados estão resumidos na Tabela 4, onde os números refletem a extensão de ligação com – representando a ligação mínima (pouca ou nenhuma ligação) e 3+ representando a ligação máxima.

TABELA 4

Anticorpo	Reduzido (exposição: 3 a 5min)	Não-Reduzido (exposição: 20 seg)
1A3	2+	2+
1D3	2+	2+
1F3	2+	2+
2B8	-	1+
2F8	2+	2+
3A12	-	2+
3B6	3+	2+
3D11	-	3+

20 Os dados na Tabela 4 demonstram que todos os anticorpos se ligam a rhHGF não-reduzido. Em oposição, os anticorpos monoclonais 1A3, 1D3, 1F3, 2F8, 3B6 se ligaram a rhHGF reduzido mas os anticorpos 2B8, 3A12, e 3D11 não se ligaram a rhHGF.

Exemplo 6 – Afinidades de Ligação

As afinidades de ligação e cinéticas de interação de cada um dos anticorpos produzidos no Exemplo 1 contra hHGF foram medidas por ressonância de plásmon de superfície.

5 Imunoglobulinas de coelho anti-camundongo (BIAcore, Nº de Catálogo BR-1005-14) foram imobilizadas sobre chips sensores CM5 de dextran carboxilado (BIAcore, Nº de Catálogo BR-1006-68) por acoplamento de amina (BIAcore, Nº de Catálogo BR-1000-50) usando um protocolo usual de acordo com as instruções do fabricante. As análises foram realizadas a
10 25°C usando PBS (GIBCO, Nº de Catálogo 14040-133) contendo 0,05% de tensoativo P20 (BIAcore, Nº de Catálogo BR-1000-54), 2 mg/mL de BSA (EMD, Nº de Catálogo 2930), e 10 mg/mL de Sal de Sódio CM-Dextran (Fluka, Nº de Catálogo 86524) como tampão de corrida.

Os anticorpos foram capturados em uma célula de fluxo individual em uma taxa de fluxo de 10 $\mu\text{L}/\text{min}$. O tempo de injeção foi variável para cada anticorpo para produzir aproximadamente 20 RU de anticorpo capturado para cada ciclo. Tampão ou HGF (R&D Systems, Nº de Catálogo 294-HGN-025) diluído em tampão de corrida foi injetado seqüencialmente sobre uma superfície de referência (nenhum anticorpo capturado) e sobre a superfície
15 ativa (anticorpo a ser testado) por 2 minutos a 60 $\mu\text{L}/\text{min}$. A fase de dissociação foi monitorada por 15 ou 90 minutos, dependendo da concentração. A superfície foi então regenerada com 10 mM de Glicina-HCl, pH 1,7 (BIAcore, Nº de Catálogo BR-1003-54) injetada por 3 minutos em uma taxa de fluxo de 60 $\mu\text{L}/\text{min}$ antes de outro ciclo ser iniciado. As concentrações de
20 HGF testadas foram 0,46 nM a 7,5 nM.
25

Os parâmetros de cinética foram determinados usando a função de cinética do programa BIAevaluation com subtração da referência. Os parâmetros de cinética para cada anticorpo k_a (constante da taxa de associação), k_d (constante da taxa de dissociação) e K_D (constante de dissociação de equilíbrio) estão resumidos na Tabela 5.
30

TABELA 5

Anticorpo	ka (1/Ms)	SE (ka)	kd (1/s)	SE (kd)	K _D (pM)	SD
1A3	1,7x10 ⁶	7,3x10 ⁴	5,2x10 ⁻⁵	8,4x10 ⁻⁷	30,1	5,6
1D3	1,7x10 ⁶	3,1x10 ⁴	8,2x10 ⁻⁵	1,7x10 ⁻⁶	54,2	27,4
1F3	1,5x10 ⁶	5,0x10 ⁴	2,6x10 ⁻⁵	6,6x10 ⁻⁷	18,1	8,2
2B8	1,6x10 ⁶	2,9x10 ⁴	2,1x10 ⁻⁵	1,4x10 ⁻⁷	13,5	4,4
3A12	1,6x10 ⁶	3,7x10 ⁴	1,6x10 ⁻⁴	1,6x10 ⁻⁶	103,0	10,4
3B6	2,0x10 ⁶	6,5x10 ⁴	3,9x10 ⁻⁵	3,2x10 ⁻⁷	17,0	3,4

Os dados na Tabela 5 demonstram que os anticorpos se ligam a hHGF com um K_D de cerca de 100 pM ou menos, cerca de 50 pM ou menos, ou 20 pM ou menos.

5 Exemplo 7 – Atividade de Neutralização de Anticorpos Anti-hHGF

Neste exemplo, os anticorpos produzidos no Exemplo 1 foram caracterizados quanto a sua habilidade de (a) inibir a ligação de hHGF a c-Met, e (b) inibir a incorporação de BrdU estimulada por HGF em células 4MBr-5.

10 a. Ensaio de Inibição de Ligação de HGF-Met (Ensaio de Neutralização)

Os anticorpos foram testados por ELISA quanto a sua habilidade de inibir a ligação de hHGF a c-Met.

Especificamente, placas de ensaio DELFIA de 96 poços Wallac (Wallac Inc., N^o de Catálogo AAAND-0001) foram revestidas com 100 µL de HGF a 6,25 µg/mL (R&D Systems, N^o de Catálogo 294-HGN-025) em tampão de revestimento de carbonato (15 mM de Na₂CO₃ e 34 mM de NaHCO₃, pH 9,0) por 16 horas a 4°C. As placas foram então bloqueadas com 200 µL de leite em pó desnatado a 5% em PBS por 1 hora em temperatura ambiente. Os anticorpos foram preparados em uma placa separada por adicionar concentrações crescentes dos anticorpos sob investigação (0,033 a 667 nM, diluição seriada de 3 vezes) a 2 nM de c-Met (R&D Systems, N^o de Catálogo 358-MT/CF) em leite em pó desnatado a 5% em PBS. 100 µL de amostra por poço foram transferidos para a placa de ensaio e incubados durante a noite a 4°C. As placas de ensaio foram então lavadas três vezes com PBS- 0,1% de Tween 20, e incubados por duas horas em temperatura ambiente

com 100 μ L/poço de anticorpo anti-c-Met humano biotilado a 2 μ g/mL (R&D Systems, N^o de Catálogo BAF358) preparado em leite em pó desnatado a 5% em PBS.

5 As placas resultantes foram então lavadas três vezes com PBS-
0,1% de Tween 20, e incubadas por 1 hora a temperatura ambiente com Es-
treptavidina marcada com Eu (Wallac, N^o de Catálogo 1244-360) diluída
1:1000 em tampão de ensaio DELFIA (Wallac, N^o de Catálogo 4002-0010).
As placas resultantes foram lavadas 3 vezes com solução de lavagem DEL-
FIA (Wallac, N^o de Catálogo 4010-0010) e incubadas com 100 μ L/poço de
10 solução de intensificação DELFIA (Wallac n^o 4001-0010) por 15 minutos em
temperatura ambiente com agitação.

As placas foram lidas em um instrumento Victor³V (Perkin Elmer) usando o método de Európio. Os valores de IC₅₀ foram calculados e estão resumidos na Tabela 6.

15 TABELA 6

Anticorpo	IC ₅₀ (nM)	SD
1A3	5,65	0,91
1D3	4,43	2,27
1F3	6,57	0,28
2B8	5,57	1,19
2F8	5,36	0,88
3A12	5,26	2,11
3B6	-	-
3D11	5,66	2,75

Os resultados demonstram que todos os anticorpos (isto é, 1D3, 1A3, 2B8, 3A12, 1F3, 3D11, e 2F8) com exceção de 3B6 neutralizam eficazmente a ligação de HGF a c-Met.

20 b. Neutralização da Incorporação de BrdU Estimulada por HGF em células 4MBr-5

Dez μ L de 12,5 nM de hHGF foram dispensados em poços individuais de uma placa de microtitulação de cultura de tecido de 96 poços (Costar, N^o de Catálogo 3903). Dez μ L de anticorpos foram diluídos seria-

damente em concentrações de 6667; 2222; 740; 247; 82; 27; 9,1; 3,0; 1,0; 0,33 nM foram adicionados a cada poço. A mistura de anticorpo de HGF foi então incubada em temperatura ambiente por 30 minutos. Células epiteliais brônquicas de macaco 4MBr-5 (ATCC, CCL208) cultivadas em F-12K (ATCC, 30-2004), 15% de FBS (Gibco 10438-026), 30 ng/mL de EGF (Sigma E9644), 1% de penicilina/estreptomicina (PS, Gibco Nº de Catálogo 15140-122) foram dissociadas com Tripsina (Gibco, Nº de Catálogo 25200-056), ressuspensas em meio de ensaio (F-12K, 2,5% de FBS, 1% de PS) a 75.000 células/mL, e 80 µL da suspensão celular foi dispensada à mistura de anticorpo de HGF.

As células resultantes foram incubadas a 37°C, 5% de CO₂. Quarenta e oito horas depois, 10 µL de BrdU a 100 µM (Roche, Nº de Catálogo 1669915) foram adicionados. Setenta e duas horas depois, o meio foi removido, as placas foram secas com secador de cabelo e foram processadas com ELISA de BrdU de acordo com as instruções do fabricante (Roche Nº de Catálogo 1669915).

O sinal luminescente foi quantificado por um leitor de placas Synergy HT (Bio-Tek). Os dados foram ajustados para uma dose-resposta sigmóide com inclinação variável com a equação $y = inferior + (superior - inferior) / (1 + 10^{(\log(EC_{50} - x) * inclinação)})$ em GraphPad Prism (GraphPad Software). Cada experimento foi repetido pelo menos 3 vezes em duplicatas e os valores de EC₅₀ médios são apresentados na Tabela 7.

TABELA 7

Anticorpo	IC ₅₀ (nM)
1A3	4,69
1D3	4,99
1F3	1,94
2B8	1,41
2F8	19,24
3A12	30,30
3B6	36,08
3D11	51,12

Os resultados na Tabela 7 demonstram que todos os anticorpos 1A3, 1D3, 1F3, 2B8, 2F8, 3A12, 3B6, e 3D11 inibem a proliferação induzida por HGF em células 4MBr-5.

Exemplo 8 – Atividade Anti-Dispersão de Anticorpos Anti-hHGF

5 Este Exemplo descreve uma caracterização dos anticorpos produzidos no Exemplo 1 quanto a sua habilidade de inibir a atividade de dispersão induzida por HGF. HGF induz “dispersão” (motilidade) de aglomerados em células MDCK (ATCC, Manassas, VA, Nº de Catálogo CCL-34).

10 Células MDCK foram semeadas em placas de cultura de tecido de 96 poços Costar (Corning Incorporated, Corning, NY, Nº de Catálogo 3595) em uma densidade de 4×10^3 células por poço em 80 μ L de MEM (ATCC, Manassas, VA, Nº de Catálogo 30-2003) contendo 10% de Soro Fetal Bovino (Invitrogen Nº de Catálogo 10438026), e 1% de penicilina-estreptomicina (Invitrogen, Nº de Catálogo 15140122). Cada um dos anticorpos a ser investigado foi diluído para 6.667 nM em MEM contendo 10% de Soro Fetal Bovino e 1% de penicilina-estreptomicina. Cada uma das diferentes diluições de anticorpo, assim como MEM contendo 10% de Soro Fetal Bovino e 1% de penicilina-estreptomicina sem anticorpo, foi então combinada separadamente com um volume igual de MEM contendo 10% de Soro Fetal Bovino e 1% de penicilina-estreptomicina, e 100 ng/ml de HGF (R&D Systems Nº de Catálogo 294-HGN-025). As diluições de anticorpo/HGF foram incubadas por 30 minutos a 25°C. Vinte μ L de cada diluição de anticorpo/HGF foi adicionada separadamente aos poços individuais, gerando uma concentração final de anticorpo de 666,7 nM, e uma concentração final de HGF de 10 ng/ml. As células MDCK foram então incubadas por 24 horas a 37°C com 5% de CO₂.

30 Após 24 horas de incubação, as células MDCK foram cuidadosamente lavadas uma vez com 100 μ L por poço de PBS gelado (Invitrogen Nº de Catálogo 14190144), e fixadas com 100 μ L por poço de metanol gelado durante agitação por 10 minutos a 25°C. As placas foram então lavadas cuidadosamente uma vez com água destilada. Um volume de 100 μ L de solução de cristal violeta, consistindo em 0,5% de cristal violeta (Sigma, St.

Louis, MO, Nº de Catálogo C3886) e etanol a 50% em água destilada, foi adicionado a cada poço, e as células foram incubadas por 20 minutos a 25°C com agitação.

Após a marcação com solução de cristal violeta, as células foram lavadas cuidadosamente três vezes com água destilada. A seguir, PBS foi adicionado a cada poço para evitar o ressecamento das amostras. As células foram visualizadas usando o microscópio Leica DMIRB (Leica Microsystems GmbH, Wetzler, Alemanha), a câmera DC500 (Leica Microsystems GmbH, Wetzler, Germany), e o programa MagnaFire 2.1C (Optronics, Goleta, CA), e as amostras foram quantificadas quanto ao nível de dispersão. Os resultados estão resumidos na Tabela 8.

TABELA 8

Inibição da Dispersão de célula MDCK induzida por HGF		
Anticorpo	Teste 1	Teste 2
1A3	++	+
1D3	++	++
1F3	+	+
2B8	+++	+++
2F8	+	+
3A12	-	-/+
3B6	++	++
3D11	-	-

- Nenhuma inibição

+++ Inibição muito grande, quase completa

++ Inibição forte

+ Inibição detectável

15

20

Os resultados na Tabela 8 demonstram que o anticorpo 2B8 inibiu a dispersão induzida por HGF mais do que os outros anticorpos. Os anticorpos 1D3 e 3B6 apresentaram um nível de inibição intermediário; o anticorpo 1A3 apresentou um nível de inibição baixo a intermediário. Os anticorpos 1F3 e 2F8 apresentaram um nível de inibição baixo; e os anticorpos 3A12 e 3D11 forneceram pouca ou nenhuma inibição detectável.

Exemplo 9 – Inibição de Fosforilação de c-Met estimulada por HGF

Este Exemplo descreve uma caracterização dos anticorpos produzidos no Exemplo 1 quanto a sua habilidade de inibir a fosforilação de c-Met estimulada por HGF em células PC-3. HGF induz a fosforilação de Met em células PC-3 (ATCC N^o CRL-1435).

As células PC-3 foram semeadas em poços individuais de placas de cultura de tecido de 96 poços Costar (Corning N^o de Catálogo 3595) em uma densidade de $4,5 \times 10^4$ células por poço em 100 μ L de F-12K (ATCC, Manassas, VA, N^o de Catálogo 30-2004) contendo 10% de Soro Fetal Bovino (Invitrogen, N^o de Catálogo 10438026) e 1% de penicilina-estreptomicina (Invitrogen, N^o de Catálogo 15140122). Após 24 horas a 37°C com 5% de CO₂, o meio foi removido, e as células foram enxaguadas uma vez com F-12K sem soro contendo 1% de penicilina-estreptomicina. As células foram então incubadas por 24 horas em 100 μ L de F-12K sem soro contendo 1% de penicilina-estreptomicina.

As 10 diferentes diluições a seguir de cada um dos anticorpos sendo investigados foram preparadas em F-12K sem soro contendo 1% de penicilina-estreptomicina: 6667 nM, 2222 nM, 741 nM; 247 nM; 82,3 nM; 27,4 nM; 9,1 nM; 3,0 nM; 1,0 nM; e 0,3 nM. Cada diluição de anticorpo, e F-12K sem soro contendo 1% de penicilina-estreptomicina sem anticorpo, foram combinadas separadamente com um volume igual de F-12K sem soro contendo 1% de penicilina-estreptomicina e 500 ng/mL de HGF (R&D Systems N^o de Catálogo 294-HGN-025). Estas diluições de anticorpo/HGF foram incubadas por 30 minutos a 25°C. Isto resultou em uma concentração final de 1,25 nM de HGF.

As células PC-3 foram lavadas uma vez com F-12K sem soro contendo 1% de penicilina-estreptomicina. A seguir, 70 μ L de F-12K sem soro contendo 1% de penicilina-estreptomicina foi adicionado às células, seguido por 10 μ L de Na₃VO₄ a 10 mM (Sigma, N^o de Catálogo S6508) em F-12K sem soro contendo 1% de penicilina-estreptomicina. As células foram então incubadas por 60 minutos a 37°C com 5% de CO₂. Após esta incubação, 20 μ L de cada diluição de anticorpo/HGF foi adicionada aos separada-

mente a poços separados, produzindo uma concentração final de HGF de 50 ng/mL, e as seguintes concentrações finais de cada anticorpo 666,7 nM; 222,2 nM; 74,1 nM; 24,7 nM; 8,23 nM; 2,74 nM; 0,91 nM; 0,30 nM; 0,10 nM; 0,03 nM. As células foram então incubadas por 10 minutos a 37°C com 5% de CO₂, e após isto, a mistura de meio/anticorpo/HGF foi removida, as placas foram plaqueadas em gelo. As células foram então lavadas uma vez com 100 µL por poço de PBS gelado (Invitrogen, Nº de Catálogo 14190144) contendo 1 mM de Na₃VO₄. As células foram então incubadas por 30 minutos a 4°C em 100 µL por poço de tampão de lise gelado consistindo em 1% de OmniPur Triton X-100 (MERCK KGaA, Darmstadt, Alemanha, Nº de Catálogo 9410), 50 mM de Tris-HCl pH 8,0, 100 mM de NaCl, 0,3 mM de Na₃VO₄, coquetel de inibidor de protease a 1x (Sigma, Nº de Catálogo P8340), e coquetel de inibidor de protease 2 a 1x (Sigma, Nº de Catálogo 5726).

15 Anticorpo anti-HGF-R humano biotilado (c-met) (R&D Systems, Nº de Catálogo BAF358) foi diluído para uma concentração de 2 µg/mL em tampão de ensaio DELFIA Assay Buffer (PerkinElmer, Turku, Finland, Nº de Catálogo 4002-0010) contendo 1% de albumina sérica bovina (Sigma Nº de Catálogo A2153), e 50 µL por poço desta diluição foram adicionados de placas de microtitulação de estreptavidina amarela (PerkinElmer, Nº de Catálogo AAAND-0005). As placas foram então incubadas com anticorpo por 30 minutos a 25°C com agitação. Após a incubação, as placas foram lavadas com solução de lavagem DELFIA (PerkinElmer, Nº de Catálogo 4010-0010), e 80 µL de cada um dos diferentes lisados de células PC-3 foram adicionados a poços individuais das placas de microtitulação de estreptavidina lavadas.

20 As placas de microtitulação de estreptavidina contendo lisados de células PC-3 foram incubadas por 60 minutos a 25°C com agitação, e então lavadas com solução de lavagem DELFIA. 100 µL de 600 ng/mL de anticorpo DELFIA Eu-N1 P-Tyr-100 (PerkinElmer, Nº de Catálogo AD0159) diluído em DELFIA Assay Buffer contendo 1% de albumina sérica bovina foi adicionada a cada poço das placas de microtitulação de estreptavidina lava-

das incubadas previamente com lisados de células PC-3. As placas foram incubadas por 60 minutos a 25°C, com agitação. As placas foram lavadas mais uma vez com solução de lavagem DELFIA. Então, 200 µL de DELFIA Enhancement Solution (PerkinElmer Nº de Catálogo 4001-0010) foram adicionados a cada poço das placas de microtitulação de estreptavina lavadas, e as placas foram incubadas no escuro por 5 minutos e 25°C, com agitação.

O sinal foi então medido usando o protocolo de Európio no leitor Victor3V (PerkinElmer). Os valores de EC₅₀ foram calculados usando Prism 4 para Windows (GraphPad Software, Inc., San Diego, CA) e a equação dose-resposta sigmóide.

Os resultados resumidos como EC₅₀s em nM estão tabulados na Tabela 9.

TABELA 9

Anticorpo	Média de dois testes	Desvio Padrão
1A3	0,684	0,242
1D3	0,984	0,129
1F3	1,19	1,01
2B8	0,287	0,104
2F8	1,39	2,12
3A12	2,00	0,553
3B6	1,01	1,11
3D11	2,28	N/A

Os dados na Tabela 9 demonstram que todos os oito anticorpos são potentes inibidores da fosforilação de c-Met induzida por HGF em células PC-3.

Exemplo 10 – Inibição de Tumor em Modelo de Xenoenxerto de U87MG

A habilidade de anticorpos monoclonais murinos da invenção inibirem o crescimento tumoral foi testado em um modelo de xenoenxerto de U87MG. Células U87MG (ATCC) foram expandidas em cultura a 37°C em uma atmosfera contendo 5% de CO₂ e 95% de ar, usando um meio que compreende meio de Eagle Modificado por Dulbecco (DMEM) com 10% de soro fetal bovino, 100 unidades/mL de penicilina e 100 µg/mL de estreptomi-

cina. As células foram subcultivadas e mantidas por desprender as células da parede da placa de cultura usando tripsina-EDTA.

Células quase confluentes foram coletadas por tripsinização e então 5×10^6 células em Matrigel 50% (BD Biosciences; Nº de Catálogo 356237) foram injetadas subcutaneamente na área dorsal superior entre a escápula de camundongos ICR SCID fêmeas de 7 semanas de idade (Taconic Labs). Os diâmetros (mm) mais longos (L) e mais curtos (W) dos tumores foram medidos com um compasso de calibre. O volume tumoral (vol) foi calculado como: $(\text{mm}^3) = L \times W^2 / 2$. Quando os tumores cresceram para aproximadamente 200 mm^3 , os camundongos que possuíam os tumores foram randomizados em 5 grupos de 10 camundongos cada. Um grupo recebeu PBS. Cada um dos outros 4 grupos recebeu um dos anticorpos 1A3, 1D3, 1F3 ou 2B8. Todos os anticorpos foram administrados em doses de 1 mg/kg de peso corporal, duas vezes por semana, por injeções intraperitoneais de 5 doses. Os volumes tumorais e os pesos corporais dos camundongos foram registrados duas vezes por semana. A inibição do crescimento tumoral foi analisada usando o teste de *t*-Student. Os resultados estão resumidos na Figura 6 e na Tabela 10.

TABELA 10

Porcentagem de inibição		
2B8 vs PBS	93%	p = 0,001
1A3 vs PBS	73%	p = 0,0075
1D3 vs PBS	51%	p = 0,075
1F3 vs PBS	60%	p = 0,027

Regressão parcial foi obtida no grupo tratado com 2B8 (Figura 6). Inibição estatisticamente significativa do crescimento foi observada nos grupos tratados com 1A3 e nos tratados com 1F3 (Tabela 10). Houve uma inibição de crescimento do tumor de 51% para 1D3 com um valor de p de 0,075. Nenhuma perda corporal significativa foi observada.

Exemplo 11 – Inibição de Tumor em Modelo de Xenoenxerto de U118

A habilidade dos anticorpos 1A3, 1D3, 1F3 e 2B8 em inibir o crescimento tumoral foi testado em um modelo de xenoenxerto de U118.

Células U118 (ATCC) foram expandidas como descrito no Exemplo 10 (acima) com relação às células U87MG.

5 Tumores subcutâneos foram estabelecidos como descrito no Exemplo 10 acima, exceto que os camundongos usados eram camundongos nude NCr fêmeas de 7 semanas de idade (Taconic), e o tratamento foi iniciado quando os tumores atingiram aproximadamente 80 mm³. Como no modelo de U87MG, todos os anticorpos foram administrados em doses de 1 mg/kg de peso corporal duas vezes por semana por injeções intraperitoneais por 4 doses. Os volumes tumorais e os pesos corporais dos camundongos foram registrados duas vezes por semana. A inibição do crescimento do tumor foi analisada usando o teste de *t*-Student. Os resultados estão resumidos na Figura 7 e na Tabela 11.

Tabela 11

Porcentagem de inibição		
2B8 vs IgG	75%	p = 0,007
1A3 vs IgG	57%	p = 0,01
1D3 vs IgG	47%	p = 0,12
1F3 vs IgG	30%	p = 0,39

15 Inibição do tumor estatisticamente significativa foi observada nos grupos tratados com 2B8 e 1A3 (Figura 7). Houve uma modesta inibição do crescimento do tumor nos grupos de 1F3 e 1D3 com valores de *p* menores do que 0,05, o qual foi definido como significância estatística neste estudo (Tabela 11). Nenhuma perda de peso corporal significativa foi observada.

Exemplo 12 – Humanização de Anticorpos Monoclonais Murinos

20 Este Exemplo descreve a humanização do anticorpo murino 2B8, junto com uma caracterização dos anticorpos humanizados resultantes, as regiões Variáveis de Cadeia Pesada e Leve de 2B8 foram “humanizadas” por dois métodos.

A. Procedimento de Humanização 1

25 No primeiro método, três regiões variáveis de cadeia pesada humanizadas e duas regiões variáveis de cadeia leve kappa humanizadas foram desenhadas com base no método de “super-humanização” descrito

em Hwang *et al.* (2005) METHODS 36:35-42; Tan *et al.* (2002) J. IMMUNOL. 169:1119-1125; Patente U.S. Nº 6.881,557.

A classe estrutural canônica de Chothia foi determinada para cada CDR de 2B8 de camundongo com base o comprimento e na composição de aminoácidos da CDR. As regiões variáveis de linhagem germinativa humanas que consistem em regiões variáveis leves e pesadas da mesma classe estrutural canônica de Chothia foram identificadas com base em alelos de referência da região variável de linhagem germinativa humana conhecidos descritos no site da internet do International Immunogenetics Information System (IMGT) (disponível na rede de alcance mundial em imgt.cines.fr e biochem.unizh.ch/antibody/Sequences/index.html). Estas regiões variáveis de linhagem germinativa humana da mesma classe estrutural foram comparadas a regiões variáveis de 2B8 de murino por calcular o percentual de identidade ou similaridade entre os resíduos de aminoácido da CDR. As regiões variáveis de linhagem germinativa humanas com a maior identidade e/ou similaridade com os resíduos da CDR de 2B8 de camundongo foram preservadas enquanto que os resíduos da CDR de 2B8 foram usados para substituir os resíduos correspondentes da região variável de linhagem germinativa humana que eram diferentes entre as CDRs de linhagem germinativa humana e CDR de 2B8 de camundongo. A região J humana que era a mais semelhante à região J de camundongo de 2B8 foi então adicionada à terminação carboxila das regiões variáveis "super-humanizadas" e estas seqüências de aminoácido foram convertidas em seqüências de ácido nucléico.

A seqüência de ácido nucléico da região variável completa foi construída usando métodos de síntese de gene por PCR (Young *et al.* (2004) NUCL. ACIDS RES. 32:e59) e clonadas em um vetor de expressão em mamífero (baseado em pcDNA3.2 DEST (Invitrogen)) contendo regiões constantes humanas (à jusante das regiões variáveis) de IgG1 (alótipo G1m(17,1)) ou Kappa (alótipo Km(3) (alelo 2)) usando técnicas de biologia molecular usuais. Todos os quatro anticorpos de IgG1 de cadeia pesada (de 2B8 quimérico a 3 cadeias pesadas humanizadas (Hu2B8 Hv1-f.1, Hu2B8

Hv5-a.1, Hu2B8 Hv5-51.1) foram expressos nas combinações possíveis com todos os 3 anticorpos de cadeia kappa (quimera de 2B8 e 2 cadeias leves humanizadas (Hu2B8 Kv1-39.1 e Hu2B8 Kv3-15.1) criando 12 proteínas de anticorpo diferentes. A ligação dos anticorpos quiméricos, quiméricos/humanizados e humanizados a HGF humano foi então medida como descrito abaixo e os resultados estão resumidos na Figura 8. Cada uma das possíveis combinações de cadeia pesada de imunoglobulina e cadeia leve de imunoglobulina são descritas abaixo na Tabela 12A.

Tabela 12A

Região variável da cadeia pesada	Região variável da cadeia leve
2B8 quimérico (SEQ ID Nº: 12)	2B8 quimérico (SEQ ID Nº: 14)
2B8 quimérico (SEQ ID Nº: 12)	Hu2B8 Kv1-39.1 (SEQ ID Nº: 173)
2B8 quimérico (SEQ ID Nº: 12)	Hu2B8 Kv3-15.1 (SEQ ID Nº: 179)
Hu2B8 Hv1-f.1 (SEQ ID Nº: 159)	2B8 quimérico (SEQ ID Nº: 14)
Hu2B8 Hv1-f.1 (SEQ ID Nº: 159)	Hu2B8 Kv1-39.1 (SEQ ID Nº: 173)
Hu2B8 Hv1-f.1 (SEQ ID Nº: 159)	Hu2B8 Kv3-15.1 (SEQ ID Nº: 179)
Hu2B8 Hv5-a.1 (SEQ ID Nº: 165)	2B8 quimérico (SEQ ID Nº: 14)
Hu2B8 Hv5-a.1 (SEQ ID Nº: 165)	Hu2B8 Kv1-39.1 (SEQ ID Nº: 173)
Hu2B8 Hv5-a.1 (SEQ ID Nº: 165)	Hu2B8 Kv3-15.1 (SEQ ID Nº: 179)
Hu2B8 Hv5-51.1 (SEQ ID Nº: 169)	2B8 quimérico (SEQ ID Nº: 14)
Hu2B8 Hv5-51.1 (SEQ ID Nº: 169)	Hu2B8 Kv1-39.1 (SEQ ID Nº: 173)
Hu2B8 Hv5-51.1 (SEQ ID Nº: 169)	Hu2B8 Kv3-15.1 (SEQ ID Nº: 179)

10 Cada uma das combinações possíveis das cadeias pesadas de imunoglobulina e cadeias leves de imunoglobulinas é descrita abaixo na Tabela 12B.

Tabela 12B

Cadeia pesada de imunoglobulina	Cadeia leve de imunoglobulina
IgG1 de 2B8 quimérico (SEQ ID Nº: 155)	Kappa de 2B8 quimérico (Km(3)) (SEQ ID Nº: 157)
IgG1 de 2B8 quimérico (SEQ ID Nº: 155)	Hu2B8 Kv1-39.1 + Constante kappa (alótipo Km(3)) (alelo 2) (SEQ ID Nº: 177)

Cadeia pesada de imunoglobulina	Cadeia leve de imunoglobulina
IgG1 de 2B8 quimérico (SEQ ID Nº: 155)	Hu2B8 Kv3-15.1 + Constante kappa (alótipo Km(3)) (alelo 2) (SEQ ID Nº: 181)
Hu2B8 Hv1-f.1 + Constante de IgG1 alótipo (G1M(17,1)) (SEQ ID Nº: 163)	Kappa de 2B8 quimérico (Km(3)) (SEQ ID Nº: 157)
Hu2B8 Hv1-f.1 + Constante de IgG1 alótipo (G1M(17,1)) (SEQ ID Nº: 163)	Hu2B8 Kv1-39.1 + Constante kappa (alótipo Km(3)) (alelo 2) (SEQ ID Nº: 177)
Hu2B8 Hv1-f.1 + Constante de IgG1 alótipo (G1M(17,1)) (SEQ ID Nº: 163)	Hu2B8 Kv3-15.1 + Constante kappa (alótipo Km(3)) (alelo 2) (SEQ ID Nº: 181)
Hu2B8 Hv5-a.1 + Constante de IgG1 alótipo (G1M(17,1)) (SEQ ID Nº: 167)	Kappa de 2B8 quimérico (Km(3)) (SEQ ID Nº: 157)
Hu2B8 Hv5-a.1 + Constante de IgG1 alótipo (G1M(17,1)) (SEQ ID Nº: 167)	Hu2B8 Kv1-39.1 + Constante kappa (alótipo Km(3)) (alelo 2) (SEQ ID Nº: 177)
Hu2B8 Hv5-a.1 + Constante de IgG1 alótipo (G1M(17,1)) (SEQ ID Nº: 167)	Hu2B8 Kv3-15.1 + Constante kappa (alótipo Km(3)) (alelo 2) (SEQ ID Nº: 181)
Hu2B8 Hv5-51.1 + Constante de IgG1 alótipo (G1M(17,1)) (SEQ ID Nº: 171)	Kappa de 2B8 quimérico (Km(3)) (SEQ ID Nº: 157)
Hu2B8 Hv5-51.1 + Constante de IgG1 alótipo (G1M(17,1)) (SEQ ID Nº: 171)	Hu2B8 Kv1-39.1 + Constante kappa (alótipo Km(3)) (alelo 2) (SEQ ID Nº: 177)
Hu2B8 Hv5-51.1 + Constante de IgG1 alótipo (G1M(17,1)) (SEQ ID Nº: 171)	Hu2B8 Kv3-15.1 + Constante kappa (alótipo Km(3)) (alelo 2) (SEQ ID Nº: 181)

Dois dos possíveis construtos de anticorpo que contêm as cadeias pesadas e leves de imunoglobulina de extensão completa contendo as regiões variáveis humanizadas são designados abaixo.

sh2B8-9 (G1m(17,1)) = hu2B8 Hv5-51.1 (+ região constante de IgG1 (alótipo G1m(17,1)) (SEQ ID Nº: 171) mais hu2B8 Kv 1-39.1 (+ região constante Kappa (alótipo Km(3) (alelo 2))) (SEQ ID Nº: 177)

sh2B8-12 (G1m(17,1)) = hu2B8 Hv5-51.1 (+ região constante de IgG1 (alótipo G1m(17,1))) (SEQ ID Nº: 171) mais hu2B8 Kv 3-15.1 (+ região constante Kappa (alótipo Km(3) (alelo 2))) (SEQ ID Nº: 181).

10 As seqüências de ácido nucléico codificantes e as seqüências de proteína que definem cada um dos anticorpos humanizados estão resu-

midas abaixo. Nesta seção, o último nucleotídeo de cada região variável é a primeira base do próximo códon gerado pela junção da região variável/constante. Este nucleotídeo está incluído na Região Variável porque ele faz parte deste éxon. Seqüências de aminoácido de Regiões Constantes listadas abaixo incluem a tradução deste códon de junção.

(1) Seqüência de Ácido Nucléico que Codifica a Cadeia Pesada de 2B8 Quimérico de Extensão Completa (Região Variável de Camundongo e Região Constante de IgG1 humana) (alótipo G1m(17,1)) (seqüência de sinal sublinhada) (SEQ ID Nº: 154)

10 1 atgggatgga gctatatcat cctcttttg gtagcaacag ctacagatgt ccactcccag
 61 gtccaactgc agcagcctgg ggctgaactg gtgaagcctg ggacttcagt ga-
 agctgtcc
 121 tgcaaggctt ctggctacac ctcaccacc tactggatgc actgggtgaa tca-
 gaggcct
 15 181 ggacaaggcc ttgagtggat tggagagatt aatcctacca acggtcatac taacta-
 caat
 241 gagaagtca agagcaaggc cacactgact gtagacaaat cctccagcac agcc-
 tacetg
 301 caactcagca gcctgacatc tgaggactct gcggtctatt actgtgcaag aaac-
 20 tatggt
 361 ggtagcatct ttgactactg gggccaaggc accactctca cagtctctc agcctc-
 cacc
 421 aagggcccat cggcttccc cctggcacc tctccaaga gcacctctgg gggca-
 cagcg
 25 481 gccctgggct gcctggtaa ggactactc cccgaaccgg tgacgggtgc gtgga-
 actca
 541 ggcgccctga ccagcggcgt gcacacctc cgggctgtcc tacagtctc aggactc-
 tac
 601 tcctcagca gcgtggtagc cgtgccctcc agcagcttg gcaccagac cta-
 30 catctgc
 661 aacgtgaatc acaagcccag caacaccaag gtggacaaga aagttgagcc caa-
 atctgt

721 gacaaaactc acacatgcc accgtgccc gcacctgaac tcttggggg
 accgtcagtc
 781 ttctcttcc cccaaaacc caaggacacc ctcatgatct cccggacccc tgaggt-
 caca
 5 841 tgcgtggtg tggacgtgag ccacgaagac cctgaggta agtcaactg
 gtacgtggac
 901 ggcgtggagg tgcataatgc caagacaaag ccgcgggagg agcagtacaa
 cagcacgtac
 961 cgtgtggtca gctcctcac cgtcctgac caggactggc tgaatggcaa ggagta-
 10 caag
 1021 tgcaaggtct ccaacaaagc cctcccagcc cccatcgaga aaaccatctc caa-
 agccaaa
 1081 gggcagcccc gagaaccaca ggtgtacacc ctgccccat cccgggatga gct-
 gaccaag
 15 1141 aaccaggta gcctgacctg cctggtaaaa ggcttctatc ccagcgacat
 cgccgtggag
 1201 tgggagagca atgggcagcc ggagaacaac tacaagacca cgctcccgt
 gctggactcc
 1261 gacggctcct tcttctcta cagcaagctc accgtggaca agagcagggtg gcag-
 20 cagggg
 1321 aacgtcttct catgctccgt gatgcatgag gctctgcaca accactacac gcagaa-
 gagc
 1381 ctctccctgt ctccgggtaa atga

(2) Seqüência de Proteína que Define a Cadeia Pesada de 2B8 Quimérico
 25 de Extensão Completa (IgG1 de 2B8 Quimérico (alótipo G1m(17,1)) (sem
seqüência de sinal) (SEQ ID Nº: 155)

1 qvqlqqpgae lvkpgtsvkl sckasgytft tywmhwwnqr pgqglewige inptnghtrny
 61 nekfkskatl tvdkssstay mqlssltted savyycarny vgsifydywgq gtlitvssas
 121 tkgpsvfpla psskstsggt aalgclvky fpepvtvsw nsgaltsgvht fpavllqssgl
 30 181 ysissvvtvp ssslgtqtyi cnvnhkpsnt kvdkkvepks cdkthtccpc papellggps
 241 vflfppkpkd tlmisrtpev tcvvvdvshe dpevkfnwyv dgvevhnakt kpreeqynst
 301 yrvsvltvl hqdwlngkey kckvsnkalp apiektiska kgqprepqvy tlpsrdelt

361 knqvsitclv kgfypsdiav ewesngqpen nykttppvld sdgsfflysk Itvdksrwqq

421 gnvfscsvmh ealhnhytqk sislspgk

(3) Seqüência de Ácido Nucléico que Codifica a Cadeia Leve de Extensão Completa de 2B8 Quimérico (Região Variável de Camundongo e Região Constante Humana) (Kappa de 2B8 Quimérico (Km(3))) (seqüência de sinal sublinhada) (SEQ ID N°: 156)

1 atggaatcac agactctggt cttcatatcc atactgctct ggttatatgg tgctgatggg

61 aacattgtaa tgaccaatc tccaaatcc atgtccatgt cagtaggaga gagggtcacc

121 ttgagctgca aggccagtga gaatgtggtt tcttatgtat cctggtatca acagaaacca

10 181 ggcagctctc ctaaactgct gatatacggg gcatccaacc ggaacactgg ggtccccgat

241 cgcttcacag gcagtggatc tgcaacagat ttactctga ccatcagcag tgtgctggct

301 gaagacctg cagattatca ctgtggcgag agttacaact atccgtacac gttcggaggg

361 gggaccaggc tgaaataaa acgaactgtg gctgcacat ctgtctcat ctcccccca

421 tctgatgagc agttgaaatc tggaactgcc tctgtgtgt gcctgctgaa taactctat

15 481 cccagagagg ccaaagtaca gtggaagggt gataacgccc tcaatcggg taactcccag

541 gagagtgtca cagagcagga cagcaaggac agcacctaca gcctcagcag caccctgacg

601 ctgagcaaag cagactacga gaaacacaaa gtctacgcct gcgaagtcac ccatcagggc

661 ctgagctcgc ccgtcacaaa gagctcaac aggggagagt gtga

(4) Seqüência de Proteína que Define a Cadeia Leve de Extensão Completa de 2B8 Quimérico (Kappa de 2B8 Quimérico (Km(3))) (sem seqüência de sinal) (SEQ ID N°: 157)

1 nivmtqspks msmsvgervt lskasenvv syvswyqqkp aqspklliyg asnrntgvpd

61 rftgsgsatd fltissvra edladyhcgq synypytfgg gtrleikrtv aapsvfifpp

121 sdeqlksgta svcllnfy preakvqwkv dnalqsgnsq esvteqdskd styslstlt

25 181 lskadyekhk vyacevthqg lsspvtksfn rgec

(5) Seqüência de Ácido Nucléico que Codifica a Região Variável da Cadeia Pesada de Hu2B8 Hv1-f.1 Humanizado (seqüência de sinal sublinhada) (SEQ ID N°: 158)

1 atggactgca cctggaggat cctcctcttg gtggcagcag ctacaggcac ccacqccgag

30 61 gtccagctgg tacagtctgg ggctgaggtg aagaagcctg gggctacagt gaaaatctcc

121 tgcaaggttt ctggatacac cttcaccacc tactggatgc actgggtgca acaggcccct

181 ggaaaagggc ttgagtggat gggagagatt aatcctacca acggtcatac taactacaat

241 gagaagttcc agggcagagt caccataacc gcggacacgt ctacagacac agcctacatg
 301 gagctgagca gcctgagatc tgaggacacg gccgtgtatt actgtgcaac aaactatggt
 361 ggtagcatct ttgactactg gggccaagga accctgggtca ccgtctctc ag

(6) Seqüência de Proteína que Define a Região Variável da Cadeia Pesada de Hu2B8 Hv1-f.1 Humanizado (sem seqüência de sinal) (SEQ ID Nº: 159)

5 1 evqlvqsgae vkkpgatvki sckvsgyftt tywmhvwqqa pgkglewmge inptnghtny
 61 nekfqgrvti tadtstdtay melsslrsed tavyycatny vgsifdywgq gtlvtvss

(7) Seqüência de Ácido Nucléico que Codifica a Região Constante da Cadeia Pesada de IgG1 Humana (alótipo G1m(17,1)) (SEQ ID Nº: 160)

10 1 cctccaccaa gggcccatcg gtcttcccc tggcaccctc ctccaagagc acctctgggg
 61 gcacagcggc cctgggctgc ctggtaagg actacttccc cgaaccgggtg acgggtgctg
 121 ggaactcagg cgccctgacc agcggcgtgc acacctccc ggctgtccta cagtctcag
 181 gactctactc cctcagcagc gtggtgaccg tgccctccag cagctggggc acccagacct
 241 acatctgcaa cgtgaatcac aagcccagca acaccaaggt ggacaagaaa gttgagccca
 15 301 aatcttgta caaaactcac acatgccac cgtgcccagc acctgaactc ctggggggac
 361 cgtcagtctt cctcttccc ccaaaccca aggacacct catgatctcc cggaccctg
 421 aggtcacatg cgtggtggtg gacgtgagcc acgaagacc tgaggtaag ttaactggt
 481 acgtggacgg cgtggagggtg cataatgcca agacaaagcc gcgggaggag cagtacaaca
 541 gcacgtaccg tgtggtcagc gtcctcaccg tcctgcacca ggactggctg aatggcaagg
 20 601 agtacaagtg caaggtctcc aacaaagccc tccagcccc catcgagaaa accatctcca
 661 aagccaaagg gcagccccga gaaccacagg tgtacacct gccccatcc cgggatgagc
 721 tgaccaagaa ccaggtcagc ctgacctgcc tggtaaaagg cttctatccc agcgacatcg
 781 ccgtggagtg ggagagcaat gggcagccgg agaacaacta caagaccacg cctcccgtgc
 841 tggactccga cggctcctc ttctctaca gcaagctcac cgtggacaag agcaggtggc
 25 901 agcaggggaa cgtcttctca tgctccgtga tgcattgaggc tctgcacaac cactacacgc
 961 agaagagcct ctccctgtct ccgggtaaat ga

(8) Seqüência de Proteína que Define a Região Constante da Cadeia Pesada de IgG1 Humana (alótipo G1m(17,1)) (SEQ ID Nº: 161). O primeiro aminoácido é derivado da tradução do último nucleotídeo da região variável e dos dois nucleotídeos do início da seqüência da Cadeia Pesada de IgG1.

1 astkgpsvfp lapsskstsg gtaalgcivk dyfpepvtvs wnsгалtsgv htfpavlqss
 61 glyslssvvt vpssslgtqt yicvnvhkps ntkvdkkvcp kscdkthtcp pcpapellgg

121 psvflfppkp kdtlmisrtp evtcvvdvs hedpevkfnw yvdgvevhna ktkpreeqyn
 181 styrvsvlt vlihdwlngk eykckvsnka lpapiektis kakgqprepq vytlppsrd
 241 ltknqvsltc lvkgfypsdi avewesngqp ennyktppv ldsdgsffly skltvdksrw
 301 qqgnvfscsv mhealthnhyt qkslslspgk

5 (9) Seqüência de Ácido Nucléico que Codifica a Região Variável da Cadeia Pesada de Hu2B8 Hv1f.1 Humanizado de Extensão Completa e a Região Constante da Cadeia Pesada de IgG1 humana (alótipo G1m(17,1)) (seqüência de sinal sublinhada) (SEQ ID N°: 162)

1 atggactgca cctggaggat cctcctcttg gtggcagcag ctacagggcac ccacgcccag
 10 61 gtccagctgg tacagtctgg ggctgaggtg aagaagcctg gggctacagt gaaaatctcc
 121 tgcaaggttt ctggatacac cttcaccacc tactggatgc actgggtgca acaggcccct
 181 ggaaaagggc ttgagtggat gggagagatt aatctacca acggctacac taactacaat
 241 gagaagtcc agggcagagt caccataacc gcggacacgt ctacagacac agcctacatg
 301 gagctgagca gcctgagatc ttaggacacg gccgtgtatt actgtgcaac aaactatggt
 15 361 ggtagcatct ttgactactg gggccaagga accctgggtca ccgtctcctc agcctccacc
 421 aagggcccat cggctctccc cctggcacc tctccaaga gcacctctgg gggcacagcg
 481 gccctgggct gctgtgtcaa ggactactc cccgaaccgg tgacggtgac gtggaactca
 541 ggcgccctga ccagcggcgt gcacacctc cggctgtcc tacagtctc aggactctac
 601 tcctcagca gcgtgggtgac cgtgccctcc agcagcttgg gcaccagac ctacatctgc
 20 661 aacgtgaatc acaagcccag caacaccaag gtggacaaga aagttgagcc caaatctgt
 721 gacaaaactc acacatgcc accgtgcca gcacctgaac tctgggggg accgtcagtc
 781 ttctcttcc ccccaaaacc caaggacacc ctcatgatct cccggacccc tgaggtcaca
 841 tgcgtggtg tggacgtgag ccacgaagac cctgaggtca agttcaactg gtacgtggac
 901 ggcgtggagg tgcataatgc caagacaaag ccgcgggagg agcagtacaa cagcacgtac
 25 961 cgtgtgtgca gcgtctcac cgtctgcac caggactggc tgaatggcaa ggagtacaag
 1021 tgcaaggtct ccaacaaagc cctcccagcc ccatcgaga aaaccatctc caaagccaa
 1081 gggcagcccc gagaaccaca ggtgtacacc ctgccccat cccgggatga gctgaccaag
 1141 aaccaggtca gctgacctg cctgtgcaaa ggcttctatc ccagcgacat cgccgtggag
 1201 tgggagagca atgggcagcc ggagaacaac tacaagacca cgctcccgt gctggactcc
 30 1261 gacggctcct tctctctca cagcaagctc accgtggaca agagcaggtg gcagcagggg
 1321 aacgtcttct catgctccgt gatgcatgag gctctgcaca accactacac gcagaagagc
 1381 ctctccctgt ctccggtaa atga

(10) Seqüência de Proteína que Define a Região Variável da Cadeia Pesada de Extensão Completa de Hu2B8 Hv1f.1 Humanizado e a Região Constante da Cadeia Pesada de IgG1 Humana (alótipo G1m(17,1)) (sem seqüência de sinal) (SEQ ID Nº: 163)

5 1 evqlvqsgae vkkpgatvki sckvsgyft tywmhwwvqqa pgkglewmge inptn-
ghtny

61 nekfqgrvti tadtstdtay melsslrsed tavyycatny vgsifdywgq gtlvtvssas

121 tkgpsvfppla psskstsggt aalgclvkdy fpepvtvswn sgaltsgvht fpavllqssgl

181 yslssvvtvp ssslgtqtyi cnvnhkpsnt kvdkkvepks cdkthtcpc papellggps

10 241 vflfpkpkd tlmisrtpev tcvvvdvshe dpevkfnwyv dgvevhnakt kpreeqynst

301 yrvsvltvl hqdwingkey kckvsnkalp apiektiska kgqprepvy tlppsrdel

361 knqvsitclv kgfypsdiav ewesngqpen nykttppvld sdgsfflysk ltvdksrwqq

421 gnvfscsvmh ealhnhytqk slslspgk

(11) Seqüência de Ácido Nucléico que Codifica a Região Variável da Cadeia Pesada de Hu2B8 Hv5a.1 Humanizado (seqüência de sinal sublinhada) (SEQ ID Nº: 164)

1 atggggtaa ccgccatcct cgcctcctc ctggctgttc tccaaggagt ctgtgccgaa
61 gtgcagctgg tgcagctctg agcagaggtg aaaaagcccg gggagtctct gaggatctcc
121 tgtaagggtt ctggatacag cttaccacc tactggatgc actgggtgcg ccagatgcc
20 181 gggaaaggcc tggagtggat gggggagatt aatcctacca acggcctac taactacaat
241 ccgtccttc aaggccacgt caccatctca gctgacaagt ccatcagcac tgctacctg
301 cagtggagca gcctgaaggc ctcgacacc gccatgtatt actgtgagag aaactatgtt
361 ggtagcatct tgactactg gggccaagga acctgtgta ccgtctcctc ag

(12) Seqüência de Proteína que Define a Região Variável da Cadeia Pesada de Hu2B8 Hv5a.1 Humanizado (sem seqüência de sinal) (SEQ ID Nº: 165)

1 evqlvqsgae vkkpgeslri sckgsgyft tywmhwwvqqa pgkglewmge inptnghtny

61 npsfqghvti sadksistay lqwsslkasd tamyycarny vgsifdywgq gtlvtvss

(13) Seqüência de Ácido Nucléico que Codifica a Região Variável da Cadeia Pesada de Extensão Completa de Hu2B8 Hv5a.1 Humanizado e a Região Constante da Cadeia Pesada de IgG1 Humana (alótipo G1m(17,1)) (seqüência de sinal sublinhada) (SEQ ID Nº: 166)

1 atggggtaa ccgccatcct cgcctcctc ctggctgttc tccaaggagt ctgtgccgaa

61 gtcagctgg tgcagtctgg agcagaggtg aaaaagcccg gggagtctct gaggatctcc
 121 tgaaggggt ctggatacag cttaccacc tactggatgc actgggtgcg ccagatgccc
 181 gggaaaggcc tggagtggat gggggagatt aatcctacca acggtcatal taactacaat
 241 ccgtcctcc aaggccacgt caccatctca gctgacaagt ccatcagcac tgcctacctg
 5 301 cagtggagca gcctgaaggc ctggacacc gccatgtatt actgtgagaa aactatggt
 361 ggtagcatct ttgactactg gggccaagga accctgttca ccgtctcctc agcctccacc
 421 aaggggccat cggtcttccc cctggcacc cctccaaga gcacctctgg gggcacagcg
 481 gccctgggct gcctgggtaa ggactactc cccgaaccgg tgacgggtgc gtggaactca
 541 ggcgcctga ccagcggcgt gcacacctc ccggctgtcc tacagtctc aggactctac
 10 601 tcctcagca gcgtgggac cgtgccctcc agcagcttgg gcaccagac ctacatctgc
 661 aacgtgaatc acaagcccag caacaccaag gtggacaaga aagttagacc caaatctgt
 721 gacaaaactc acacatgccc accgtgcca gcacctgaac tctgggggg accgtcagtc
 781 ttctcttcc cccaaaacc caaggacacc ctcatgatct cccggacccc tgaggtcaca
 841 tgcgtggggtg tggacgtgag ccacgaagac cctgaggtca agtcaactg gtacgtggac
 15 901 ggcgtggagg tgcataatgc caagacaaag ccgcgggagg agcagtacaa cagcacgtac
 961 cgtgtggta cgtcctcac cgtcctgac caggactggc tgaatggcaa ggagtacaag
 1021 tgcaaggtct ccaacaaagc cctcccagcc cccatcgaga aaaccatctc caaagccaaa
 1081 gggcagcccc gagaaccaca ggtgtacacc ctgccccat cccgggatga gctgaccaag
 1141 aaccaggta gcctgacctg cctggtaaaa ggcttctatc ccagcgacat cgccgtggag
 20 1201 tgggagagca atgggcagcc ggagaacaac tacaagacca cgctcccggt gctggactcc
 1261 gacggctcct tctcctcta cagcaagctc accgtggaca agagcaggtg gcagcagggg
 1321 aacgtctct catgctccgt gatgcatgag gctctgcaca accactacac gcagaagagc
 1381 ctctccctgt ctccgggtaa atga

(14) Seqüência de Proteína que Define a Região variável da cadeia Pesada
 de Extensão Completa de Hu2B8 Hv5a.1 Humanizado e (G1m(17,1) alótipo)
 a Região Constante da Cadeia Pesada de IgG1 Humana (sem seqüência de
 sinal) (SEQ ID Nº: 167)

1 evqlvqsgae vkkpgeslri sckgsgysft tywmhwwrqrn pgkglewmge inptn-
 ghntny
 30 61 npsfqghvti sadksistay lqwsslkasd tamyycarny vgsifdywgq gtlvtvssas
 121 tkgpsvfpla psskstsggt aalgclvkdy fpepvtvswn sgaltsgvht fpavllqssgl
 181 yslssvvtvp ssslgtqiyi cnvnhkpsnt kvdkkvepks cdkthtppc papellgpps

241 vflfppkpkd tlmisrtpv tcvvvdvshe dpevkfnwyv dgvevhnakt kpreeqynst
 301 yrvsvltvl hqdwlngkey kckvsnkalp apiektiska kgqprepvy tlpsrdelt
 361 knqvsltclv kgfypsdiav ewesngqpen nykttppvld sdgsfflysk ltvdksrwqq
 421 gnvfscsvmh ealhnhytqk slslspgk

5 (15) Seqüência de Ácido Nucléico que Codifica a Região variável da cadeia Pesada de Hu2B8 Hv5-51.1 Humanizado (seqüência de sinal sublinhada)
 (SEQ ID Nº: 168)

1 atggggtaa ccgcatcct cgcctctc ctggctgtc tccaaggagt ctgtccgaa
 61 gtcagctgg tgcagtctg agcagagtg aaaaagccc gggagtctt gaagatctc
 10 121 tgtaagggt ctggatacag cttaccacc tactggatgc actgggtgc ccagatgcc
 181 gggaaaggcc tggagtggat gggggagatt aatcctacca acggtcatac taactacaat
 241 ccgtcttcc aaggccaggt caccatctca gctgacaagt ccatcagcac tgctactcg
 301 cagtggagca gcctgaaggc ctggacacc gccatgtatt actgtgagag aaactatgtt
 361 ggtagcatct ttgactactg gggccaagga accctgttca ccgtctctc ag

15 (16) Seqüência de Proteína que Define a Seqüência Variável de Cadeia Pesada de Hu2B8 Hv5-51.1 Humanizado (sem seqüência de sinal) (SEQ ID Nº: 169)

1 evqlvqsgae vkkpgesiki sckgsgysft tywmhwwrqm pgkglewmge
 inptnghtny

20 61 npsfqqvti sadksistay lqwsslkasd tamyycarny vgsifdywgq gtlvtvss

(17) Seqüência de Ácido Nucléico que Codifica a Região variável da cadeia Pesada de Extensão Completa de Hu2B8 Hv5-51.1 Humanizado e a Região Constante da Cadeia Pesada de IgG1 Humana (G1m(17,1) alótipo) (seqüência de sinal sublinhada) (SEQ ID Nº: 170)

25 1 atggggtaa ccgcatcct cgcctctc ctggctgtc tccaaggagt ctgtccgaa
 61 gtcagctgg tgcagtctg agcagagtg aaaaagccc gggagtctt gaagatctc
 121 tgtaagggt ctggatacag cttaccacc tactggatgc actgggtgc ccagatgcc
 181 gggaaaggcc tggagtggat gggggagatt aatcctacca acggtcatac taactacaat
 241 ccgtcttcc aaggccaggt caccatctca gctgacaagt ccatcagcac tgctactcg
 30 301 cagtggagca gcctgaaggc ctggacacc gccatgtatt actgtgagag aaactatgtt
 361 ggtagcatct ttgactactg gggccaagga accctgttca ccgtctctc agcctccacc
 421 aagggcccat cgttctccc cctggcacc tctccaaga gcacctctg gggcacagcg

481 gccctgggct gcctggtaa ggactactc cccgaaccgg tgacggtgac gtggaactca
 541 ggcgcctga ccagcggcgt gcacacctc ccggctgtcc tacagtctc aggactctac
 601 tcctcagca gcgtggtag cgtgccctcc agcagcttg gcaccagac ctacatctg
 661 aacgtgaatc acaagcccag caacaccaag gtggacaaga aagttgagcc caaatctgt
 5 721 gacaaaactc acacatgcc accgtgcca gcacctgaac tctgggggg accgtcagtc
 781 ttctcttcc ccccaaaacc caaggacacc ctcatgatct cccggacccc tgaggtcaca
 841 tgcgtggtag tggacgtgag ccacgaagac cctgaggtca agttcaactg gtacgtggac
 901 ggcgtggagg tgcataatgc caagacaaag ccgcgggagg agcagtacaa cagcacgtac
 961 cgtgtggta gcgtctcac cgtctgcac caggactggc tgaatggcaa ggagtacaa
 10 1021 tgcaaggtct ccaacaaagc cctcccagcc cccatcgaga aaacctctc caaagccaaa
 1081 gggcagcccc gagaaccaca ggtgtacacc ctgccccat cccgggatga gctgaccaag
 1141 aaccaggtca gcctgacctg cctggtcaaa ggcttctatc ccagcgacat cgccgtggag
 1201 tgggagagca atgggcagcc ggagaacaac tacaagacca cgctcccgt gctggactcc
 1261 gacggctct tcttctcta cagcaagctc accgtggaca agagcaggtg gcagcagggg
 15 1321 aacgtctct catgctccgt gatgcatgag gctctgcaca accactacac gcagaagagc
 1381 ctctccctgt ctccgggtaa atga

(18) Seqüência de Proteína que Define a Região variável da cadeia Pesada de Extensão Completa de Hu2B8 Hv5-51.1 Humanizado e a Região Constante da Cadeia Pesada de IgG1 Humana (alótipo G1m(17,1)) (sem seqüência de sinal) (SEQ ID Nº: 171)

1 evqlvqsgae vkkpgeslki sckgsgysft tywmhwwrqrn pgkglewmge inptnghtny
 61 npsfqqqvti sadksistay lqwsslkasd tamyycarny vgsifdywgq gtlvtvssas
 121 tkgpsvfpla psskstsggt aalgclvdy fpepvtvswn sgaltsgvht fpavlgssgl
 181 yslssvvtvp ssslgtqyi cnvnhkpsnt kvdkkvepks cdkthtcppc papellggps
 25 241 vflfppkpkd tlmisrtpv tcvvvdvshe dpevkfnwyv dgvevhnakt kpreeqynst
 301 yrvsvltvl hqdwlngkey kckvsnkalp apiektiska kgqprepvy tlpssrdelt
 361 knqvsiltclv kgfypsdiav ewesngqpen nykttppvld sdgsfflysk ltvdksrwqq
 421 gnvfscsvmh ealnhhytqk slslspgk

(19) Seqüência de Ácido Nucléico que Codifica a Região Variável da Cadeia Kappa de Hu2B8 Kv1-39.1 Humanizado (seqüência de sinal sublinhada) (SEQ ID Nº: 172). Dois possíveis ATGs de início são mostrados em letras maiúsculas.

1 ATGgacATGa gggccccgc tcagctcctg gggctcctgc tactctggct ccgaggtgcc
 61 agatgtgaca tccagatgac ccagctcca tctccctgt ctgcatctgt aggagacaga
 121 gtcaccatca cttgcaaggc cagtgagaat gtggttctt atgtatcctg gtatcagcag
 181 aaaccaggga aagcccctaa gctcctgac tatggggcat ccaaccggaa cactggggtc
 5 241 ccatcaaggt tcagtgagcagg tggatctggg acagatttca ctctaccat cagcagtctg
 301 caacctgaag atttgcaac ttactactgt gggcagagtt acaactatcc gtacacgttt
 361 ggccagggga ccaagctgga gatcaaac

(20) Seqüência de Proteína que Define a Região Variável da Cadeia Kappa de Hu2B8 Kv1-39.1 Humanizado (sem seqüência de sinal) (SEQ ID Nº: 173)

10 1 diqmtqspss lsasvgrvt itckasenvv syvswyqqkp gkapklliyg asnrntgvps
 61 rfsqsgsgtd fittisslqp edfatyycgq synpytfgq gtleik

(21) Seqüência de Ácido Nucléico que Codifica a Região Constante da Cadeia Kappa Humana (alótipo Km(3)) (alelo 2) (SEQ ID Nº: 174)

1 gaactgtggc tgcaccatct gtctcatct tcccgccatc tgatgagcag ttgaaatctg
 15 61 gaactgcctc tgtgtgtgc ctgctgaata acttctatcc cagagaggcc aaagtacagt
 121 ggaaggtgga taacgccctc caatcgggta actcccagga gagtgtcaca gagcaggaca
 181 gcaaggacag cacctacagc ctgagcagca cctgacgct gagcaaagca gactacgaga
 241 aacacaaagt ctacgctgc gaagtcaccc atcagggcct gagctcgccc gtcacaaaga
 301 gcttcaacag gggagagtgt tga

20 (22) Seqüência de Proteína que Define a Região Constante da Cadeia Kappa Humana (alótipo Km(3)) (alelo 2) (SEQ ID Nº: 175). O primeiro aminoácido é derivado da tradução do último nucleotídeo da região variável e dos dois nucleotídeos do início da Seqüência da Cadeia Leve Kappa.

1 rtvaapsvfi fppsdeqlks gtasvvclln nfybreakvq wkvdnalqsg nsqesvteqd
 25 61 skdstyslss titlskadye khkvacevt hqglsspvtk sfnrgec

(23) Seqüência de Ácido Nucléico que Codifica a Região Variável da Cadeia Leve de Extensão Completa de Hu2B8 Kv1-39.1 Humanizado e a Região Constante da Cadeia Kappa Humana (alótipo Km(3)) (alelo 2) (seqüência de sinal sublinhada) (SEQ ID Nº: 176)

30 1 atggacatga gggccccgc tcagctcctg gggctcctgc tactctggct ccgaggtgcc
 61 agatgtgaca tccagatgac ccagctcca tctccctgt ctgcatctgt aggagacaga
 121 gtcaccatca cttgcaaggc cagtgagaat gtggttctt atgtatcctg gtatcagcag

181 aaaccagga aagcccctaa gtcctgatc tatgggcat ccaaccgaa cactggggtc
 241 ccatcaaggt tcagtggcag tggatctggg acagattca ctctacccat cagcagtctg
 301 caacctgaag atttgcaac ttactactgt gggcagagtt acaactatcc gtacacgttt
 361 ggccagggga ccaagctgga gatcaaacga actgtggctg caccatctgt cttcatcttc
 5 421 ccgccatctg atgagcagtt gaaatctgga actgcctctg ttgtgtcct gctgaataac
 481 ttctatccca gagaggcaa agtacagtgg aaggtggata acgccctcca atcgggtaac
 541 tcccaggaga gtgtcacaga gcaggacagc aaggacagca cctacagcct cagcagcacc
 601 ctgacgctga gaaagcaga ctacgagaaa cacaaagtct acgcctgcga agtcacccat
 661 cagggcctga gctgcccgt cacaaagagc ttcaacaggg gagagtgtg a

10 (24) Seqüência de Proteína que Define a Região Variável da Cadeia Leve de Extensão Completa de Hu2B8 Kv1-39.1 Humanizado e a Região Constante da Cadeia Kappa Humana (alótipo Km(3)) (alelo 1) (SEQ ID Nº: 177)

1 diqmtqspss lsasvgrvt itckasenvv syvswyqqkp gkapklliyg asnrntgvps
 61 rfsrgsgtd fltisslqp edfatyycgq synpytfgq gtleikrtv aapsvfifpp
 15 121 sdeqlksgta svvcllnfy preakvqwkv dnalqsgnsq esvteqdsd styslsstlt
 181 lskadyekhk vyacevthqg lsspvtksfm rgec

(25) Seqüência de Ácido Nucléico que Codifica a Região Variável da Cadeia Leve de Hu2B8 Kv3-15.1 Humanizado (seqüência de sinal sublinhada) (SEQ ID Nº: 178)

20 1 atggaagccc cagcgcagct tctctctc ctgctactct ggctcccaga taccactgga
 61 gaaatagtga tgacgcagtc tccagccacc ctgtctgtgt ctccagggga aagagccacc
 121 ctctctgca aggccagtga gaatgtggtt tcttatgtat cctggtacca gcagaaacct
 181 ggccaggctc ccaggctcct catctatggg gcatccaacc ggaactctgg tatcccagcc
 241 aggttcagtg gcagtgggtc tgggacagag ttactctca ccatcagcag cctgcagtct
 25 301 gaagattttg cagttatta ctgtgggcag agttacaact atccgtacac gtttgccag
 361 ggaccaagc tggagatcaa ac

(26) Seqüência de Proteína que Define a Região Variável da Cadeia Leve de Hu2B8 Kv3-15.1 Humanizado (sem seqüência de sinal) (SEQ ID Nº: 179)

1 eivmtqspat lsvspgerat lskasenvv syvswyqqkp gqaprlliyg asnrntgipa
 30 61 rfsrgsggte fltisslqs edfavyycgq synpytfgq gtleik

(27) Ácido Nucléico que Codifica a Região Variável de Cadeia Leve de Extensão Completa de Hu2B8 Kv3-15.1 Humanizado e a Região Constante da

Cadeia Kappa Humana (alótipo Km(3)) (alelo 2) (seqüência de sinal sublinhada) (SEQ ID Nº: 180)

1 atggaagccc cagcqcagct tctctcctc ctgctactct ggctcccaga taccactgga
 61 gaaatagtga tgacgcagtc tccagccacc ctgtctgtgt ctccagggga aagagccacc
 5 121 ctctctgca aggccagtga gaatgtggtt tcttatgtat cctggtacca gcagaaacct
 181 ggccaggctc ccaggctcct catctatggg gcatccaacc ggaacactgg tatcccagcc
 241 aggttcagtg gcagtgggtc tgggacagag ttactctca ccatcagcag cctgcagctt
 301 gaagatttg cagttatta ctgtgggcag agttacaact atccgtacac gttggccag
 361 gggaccaagc tggagatcaa acgaactgtg gctgcacat ctgttctcat ctcccgcc
 10 421 tctgatgagc agtgaaatc tggaactgcc tctgtgtgt gcctgctgaa taacttctat
 481 ccagagagg ccaaagtaca gtggaagggtg gataacgcc tcaatcggg taactcccag
 541 gagagtgtca cagagcagga cagcaaggac agcacctaca gcctcagcag caccctgacg
 601 ctgagcaaag cagactacga gaaacacaaa gtctacgcct gcgaagtcac ccatcagggc
 661 ctgagctcgc ccgtcacaaa gagctcaac aggggagagt gttga

15 (28) Seqüência de Proteína que Define a Região Variável da Cadeia Leve de Hu2B8 Kv3-15.1 Humanizado e a Região Constante da Cadeia Kappa Humana (Km(3) alótipo) (alelo 2) (sem seqüência de sinal) (SEQ ID Nº: 181)

1 eivmtqspat lsvspgerat lskcasenvv syvswyqqkp gqaprlliyg asnrntgipa
 61 rfsqsgsgte flltisslqs edfavyycgq synypytfqg gtleikrtv aapsvfifpp
 20 121 sdeqlksgta svcllnfy preakvqwkv dnalqsgnsq esvteqskd styslsltl
 181 lskadyekhk vyacevthqg lsspvtksfm rgec

25 Para conveniência, a Tabela 13 fornece um quadro de concordância mostrando uma correspondência entre as seqüências de extensão completa e os anticorpos discutidos nesta seção com aqueles apresentados na Listagem de Seqüência.

TABELA 13

SEQ. ID Nº:	Proteína ou Ácido Nucléico
154	IgG1 de 2B8 quimérico (G1m(17,1)) – ácido nucléico
155	IgG1 de 2B8 quimérico (G1m(17,1)) – proteína
156	Kappa de 2B8 quimérico (Km(3)) – ácido nucléico
157	Kappa de 2B8 quimérico (Km(3)) – proteína

158	Região Variável da Cadeia Pesada de Hu2B8 Hv1f.1 – ácido nucléico
159	Região Variável da Cadeia Pesada de Hu2B8 Hv1f.1 – proteína
160	Região Constante da Cadeia Pesada de IgG1 Humana (Alótipo G1m(17,1)) – ácido nucléico
161	Região Constante da Cadeia Pesada de IgG1 Humana (Alótipo G1m(17,1)) – proteína
162	Hu2B8 Hv1f.1 + Constante de IgG1 (Alótipo G1m(17,1)) – ácido nucléico
163	Hu2B8 Hv1f.1 + Constante de IgG1 (Alótipo G1m(17,1)) – proteína
164	Região Variável da Cadeia Pesada de Hu2B8 Hv5a.1 – ácido nucléico
165	Região Variável da Cadeia Pesada de Hu2B8 Hv5a.1 – proteína
166	Hu2B8 Hv5a.1 + Constante de IgG1 (Alótipo G1m(17,1)) – ácido nucléico
167	Hu2B8 Hv5a.1 + Constante de IgG1 (Alótipo G1m(17,1)) – proteína
168	Região Variável da Cadeia Pesada de Hu2B8 Hv5-51.1 – ácido nucléico
169	Região Variável da Cadeia Pesada de Hu2B8 Hv5-51.1 – proteína
170	Hu2B8 Hv5-51.1 + Constante de IgG1 (Alótipo G1m(17,1)) – ácido nucléico
171	Hu2B8 Hv5-51.1 + Constante de IgG1 (Alótipo G1m(17,1)) – proteína
172	Hu2B8 Kv1-39.1 Região Variável de Cadeia Kappa – ácido nucléico
173	Hu2B8 Kv1-39.1 Região Variável de Cadeia Kappa – proteína
174	Região Constante da Cadeia Kappa Humana (Alótipo Km(3)) (alelo 2) – ácido nucléico
175	Região Constante da Cadeia Kappa Humana (Alótipo Km(3)) (alelo 2) – proteína
176	Hu2B8 Kv1-39.1 + Constante kappa (Alótipo Km(3)) (alelo 2) – ácido nucléico
177	Hu2B8 Kv1-39.1 + Constante kappa (Alótipo Km(3)) (alelo 2) – proteína
178	Região Variável de Cadeia Kappa de Hu2B8 Kv3-15.1 – ácido nucléico
179	Região Variável de Cadeia Kappa de Hu2B8 Kv3-15.1 – proteína
180	Hu2B8 Kv3-15.1 + Constante kappa (Alótipo Km(3)) (alelo 2) – ácido nucléico
181	Hu2B8 Kv3-15.1 + Constante kappa (Alótipo Km(3)) (alelo 2) – proteína

B. Procedimento de Humanização 2

O Segundo método de humanização empregado para reduzir a imunogenicidade do anticorpo 2B8 de camundongo se baseia no método

descrito por Studnicka *et al.* (1994) PROTEIN ENG. 7:805-814. As regiões variáveis de linhagem germinativa pesada e kappa humanas mais idênticas (em aminoácidos) àquelas de 2B8 de camundongo foram identificadas. Os resíduos que diferiram entre camundongo e humano foram convertidos na seqüência humana dependendo da probabilidade do risco de que tal alteração afetasse a ligação ou imunogenicidade. Resíduos de baixo risco (isto é, resíduos que quando trocados provavelmente não afetariam a ligação de antígeno e também reduziriam potencial imunogenicidade) foram trocados para o aminoácido humano na região variável pesada (criando LR2B8HC) e a região variável kappa (criando LR2B8LC). Adicionalmente, os resíduos de baixo risco e médio risco (isto é., resíduos que quando trocados têm alguma probabilidade de ter um efeito sobre a ligação e também reduziriam potencial imunogenicidade) foram trocados para o aminoácido humano na região variável pesada (criando LRMR2B8HC) e a região variável kappa (criando LRMR2B8LC). A região constante de cadeia pesada de IgG1 (alótipo G1m(3) (alelo 1)) foi adicionada à terminação carboxila de duas regiões variáveis pesadas manipuladas humanas e a região constante kappa humana (alótipo Km(3) (alelo 1)) foi adicionada à terminação carboxila de duas regiões variáveis leves manipuladas, criando assim quatro cadeias de anticorpo humanas manipuladas. Seqüências de ácido nucléico da região variável foram primeiro sintetizadas por métodos de síntese gênica e então adicionadas às seqüências da região constante humana. Estes anticorpos manipulados foram clonados em vetores de expressão de proteína de mamífero, e a proteína foi expressa nas quatro combinações possíveis de cadeia pesada mais cadeia leve. A ligação dos anticorpos quiméricos, quiméricos/humanizados, ou humanizados a HGF humano foi medida usando técnicas convencionais, conforme descrito abaixo.

As seqüências de ácido nucléico codificantes e as seqüências de proteína que definem cada um dos anticorpos humanizados estão resumidas abaixo. Nesta seção, o último nucleotídeo de cada região variável é a primeira base do próximo códon gerado pela junção da região variável/constante. Este nucleotídeo está incluído na Região Variável porque ele

faz parte deste éxon. As seqüências de aminoácido das Regiões Constantes listadas abaixo incluem a tradução deste códon de junção.

(1) Seqüência de Ácido Nucléico que Codifica a Região Variável da Cadeia Pesada de LR2B8HC Humanizado (seqüência de sinal sublinhada) (SEQ ID

5 N°: 182)

1 atgggctggt catatattat tctctttctt gttgctaccg ctaccgatgt qcactctcaa
 61 gtccaactcg tacaaccagg cgctgaagtc gtaaaaccgg gaacatctgt taaactctca
 121 tgcaaagcct caggatacac ttccacaact tactggatgc attgggtcaa tcaagcccc
 181 ggacaaggcc tcgaatggat tggcgaaatt aaccaacta acggacatac taattataat
 10 241 gaaaaattta agggcaaagc tacactcacc gtcgataaat caacctctac agcttatatg
 301 gaacttcat ccctgagatc agaagataca gccgtctact attgcccag aaactacgta
 361 ggatcaatat tcgattactg gggtaaggc actctctca cagtcagctc ag

(2) Seqüência de Proteína que Define a Região Variável da Cadeia Pesada de LR2B8HC Humanizado (sem seqüência de sinal) (SEQ ID N°: 183)

15 1 qvqlvqpgae vvkpgtsvkl sckasgytft tywmhwvnrq pgqglewige inptnghtny
 61 nekfkgtatl tvdkststay melsslrsed tavyycarny vgsifydwgq gtlitvss

(3) Seqüência de Ácido Nucléico que Codifica a Região Constante da Cadeia Pesada de IgG1 Humana (Alótipo G1m(3)) (alelo 1) (SEQ ID N°: 184)

1 ccagcacaaa gggcccatcg gtcttcccc tggcaccctc ctccaagagc acctctgggg
 20 61 gcacagcggc cctgggctgc ctggtaagg actacttccc cgaaccgggtg acggtgtcgt
 121 ggaactcagg cgccctgacc agcggcgtgc acaccttccc ggctgtccta cagtcctcag
 181 gacttactc cctcagcagc gtggtgaccg tgccctccag cagcttgggc acccagacct
 241 acatctgcaa cgtgaatcac aagcccagca acaccaaggt ggacaagaga gttgagccca
 301 aatcttgtga caaaactcac acatgtccac cgtgccccagc acctgaactc ctggggggac
 25 361 cgtcagctt cctcttcccc ccaaaacca aggacaccct catgatctcc cggaccctg
 421 aggtcacatg cgtggtggtg gacgtgagcc acgaagacc tgaggtaag tcaactggt
 481 acgtggacgg cgtggagggt cataatgcca agacaaagcc gcgggaggag cagtacaaca
 541 gcacgtaccg tgtggtcagc gtctcaccg tcctgacca ggactggctg aatggcaagg
 601 agtacaagtg caaggtctcc acaaagccc tccagcccc catcgagaaa accatctcca
 30 661 aagccaaagg gcagccccga gaaccacagg tgtacacct gccccatcc cgggaggaga
 721 tgaccaagaa ccaggtcagc ctgacctgcc tggtaaaagg ctctatccc agcgacatcg
 781 ccgtggagtg ggagagcaat gggcagccgg agaacaacta caagaccacg cctcccgtgc

841 tggactccga cggctcctc ttctctata gcaagctcac cgtggacaag agcaggtggc
 901 agcaggggaa cgtcttca tgctccgtga tgcattgaggc tctgcacaac cactacacgc
 961 agaagagcct ctccctgtcc ccgggtaaat ga

- 5 (4) Seqüência de Proteína que Define a Região Constante da Cadeia Pesada de IgG1 Humana (Alótipo G1m(3)) (alelo 1 ou 2) (SEQ ID Nº: 185). O primeiro aminoácido é derivado da tradução do último nucleotídeo da região variável e dos dois nucleotídeos do início da seqüência da Cadeia Pesada de IgG1.

1 astkgpsvfp lapsskstsg gtaalgclvk dyfpepvtvs wnsgaltsgv htfpavlqss
 10 61 glylsssvvt vpssslgtqt yicnvnhkps ntkvdkrvep kscdkthtcp pcpapellgg
 121 psvflfppkp kdtlmisrtp evtcvvvdvs hedpevkfnw yvdgvevhna ktkpreeqyn
 181 styrvsvlt vihqdwlngk eykckvsnka lpapiektis kakgqprepq vytlppsree
 241 mtknqvsltc lvkgfypsdi avewesngqp ennykttppv ldsdgsffly skltvdksrw
 301 qqgnvfscsv mhealhnhyt qkslslspgk

- 15 (5) Seqüência de Ácido Nucléico que Codifica a Região Variável da Cadeia Pesada de de Extensão Completa de LR2B8HC Humanizado e a Região Constante da Cadeia Pesada de IgG1 Humana (Alótipo G1m(3)) (alelo 1) (seqüência de sinal sublinhada) (SEQ ID Nº: 186)

1 atgggctggt catatattat tctcttctt gttgctaccg ctaccgatgt gcactctcaa
 20 61 gtccaactcg tacaaccagg cgctgaagtc gtaaaacccg gaacatctgt taaactctca
 121 tgcaaagcct caggatacac ttccacaact tactggatgc attgggtcaa tcaagccccc
 181 ggacaaggcc tcgaatggat tggcgaatatt aaccacaacta acggacatac taattataat
 241 gaaaaatta agggcaaagc tacactcacc gtcgataaat caacctctac agcttatatg
 301 gaactttcat cctgagatc agaagataca gccgttact attgcgccag aaactacgta
 25 361 ggatcaatat tcgattactg gggtaaggc actctctca cagtcagctc agccagcaca
 421 aagggcccat cggcttccc cctggcacc tctccaaga gcacctctgg gggcacagcg
 481 gccctgggct gcctggtaaa ggactacttc cccgaaccgg tgacgggtgc gtggaactca
 541 ggcgcctga ccagcggcgt gcacaccttc ccggctgtcc tacagtctc aggactctac
 601 tcctcagca gcgtggtgac cgtgccctcc agcagcttg gcaccagac ctacatctgc
 30 661 aacgtgaatc acaagcccag caacaccaag gtggacaaga gagttgagcc caaatctgt
 721 gacaaaactc acacatgtcc accgtgccca gcacctgaac tctgggggg accgtcagtc
 781 ttctcttc cccaaaacc caaggacacc ctcatgatct cccggacccc tgaggtcaca

841 tgcgtggtgg tggacgtgag ccacgaagac cctgagggtca agtcaactg gtacgtggac
 901 ggcgtggagg tgcataatgc caagacaaag cccgcccagg agcagtacaa cagcacgtac
 961 cgtgtggtca gcgtcctcac cgtcctgcac caggactggc tgaatggcaa ggagtacaag
 1021 tgcaaggtct ccaacaaagc cctcccagcc cccatcgaga aaacatctc caaagccaaa
 5 1081 gggcagcccc gagaaccaca ggtgtacacc ctgccccat cccgggagga gatgaccaag
 1141 aaccagggtca gcctgacctg cctgggtcaaa ggcttctatc ccagcgacat cgccgtggag
 1201 tgggagagca atgggcagcc ggagaacaac tacaagacca cgctcccgt gctggactcc
 1261 gacggctcct tcttctcta tagcaagctc accgtggaca agagcagggtg gcagcagggg
 1321 aacgttctct catgctccgt gatgcatgag gctctgcaca accactacac gcagaagagc
 10 1381 ctctccctgt ccccggtaa atga

(6) Seqüência de Proteína que Define a Região Variável da Cadeia Pesada de Extensão Completa de LR2B8HC Humanizado e a Região Constante da Cadeia Pesada de IgG1 Humana (Alótipo G1m(3)) (alelo 1) (sem seqüência de sinal) (SEQ ID Nº: 187)

15 1 qvqlvqpgae vvkpgtsvkl sckasgytft tywmhwnqa pggglewige inptnghtny
 61 nekfkgtatl tvdkststay melsslrsed tavyycarny vgsifdywgq gtlitvssas
 121 tkgpsvfpla psskstsggt aalgclvkdy fpepvtvsw nsgaltsgvht fpavllqssgl
 181 yslssvvtvp ssslgtqtyi cnvnhkpsnt kvdkrvepks cdkthtcppc papellgpps
 241 vflfppkpkd tlmisrpev tcvvvdvshe dpevkfnwyv dgvevhnakt kpreeqynst
 20 301 yrvsvltvl hqdwlngkey kckvsnkalp apiektiska kgqprepvy tlppsreemt
 361 knqvsitclv kgfypsdiav ewesngqpen nykttppvld sdgsfflysk ltvdksrwqq
 421 gnvfscsvmh ealhnhytqk slslspgk

(7) Seqüência de Ácido Nucléico que Codifica a Região Variável da Cadeia Pesada de LRMR2B8HC Humanizado (seqüência de sinal sublinhada) (SEQ ID Nº: 188)

25 1 atgggttgg catatattat actctttctc gtagccaccg ccaccgacgt acactctcag
 61 gtcaactcg tacaaccgg cgccgaagtc aagaaaccag gaacatcagt caaactctca
 121 tgtaaagcaa gcggatacac ctttactact tattggatgc attgggtaag acaagcccc
 181 ggacaaggac tcgaatggat aggcgaaata aatcccacta atggacatac aaattataat
 30 241 caaaaatttc aaggacgcgc tacactcacc gtcgataaat caacctcaac cgcatacatg
 301 gaactcagct cctccgatc cgaagacact gccgtttatt attgtgccag aaactatgta
 361 ggatctattt tcgattactg gggacaagga acacttctca ccgtaagctc ag

(8) Seqüência de Proteína que Define a Região Variável da Cadeia Pesada de LR-MR2B8HC Humanizado (sem seqüência de sinal) (SEQ ID Nº: 189)

1 qvqlvqpgae vkkpgtsvkl sckasgytft tywmhwvrqa pggglewige inptnghtny
61 nqkfqgratl tvdkststay melsslr sed tavyycarny vgsifydwgq gtlitvss

5 (9) Seqüência de Ácido Nucléico que Codifica a Região Variável da Cadeia Pesada de de Extensão Completa de LRMR2B8HC Humanizado e a Região Constante da Cadeia Pesada de IgG1 Humana (Alótipo G1m(3)) (alelo 1) (seqüência de sinal sublinhada) (SEQ ID Nº: 190)

1 atgggttggg catatattat actctttctc gtagccaccg ccaccgacgt acactctcag
10 61 gttcaactcg tacaaccg cgccgaagtc aagaaaccag gaacatcagt caaactctca
121 tgtaaagcaa gcggatacac ctttactact tattggatgc attgggtaag acaagccccc
181 ggacaaggac tcgaatgat aggcgaaata aatcccacta atggacatac aaattataat
241 caaaaattc aaggacgcg tacactcacc gtcgataaat caacctcaac cgcatacatg
301 gaactcagct cctccgatc cgaagacact gccgtttatt attgtgccag aaactatgta
15 361 ggatctatt tcgattactg gggacaagga acacttctca ccgtaagctc agccagcaca
421 aagggcccat cggcttccc cctggcacc tcctccaaga gcacctctgg gggcacagcg
481 gccctgggct gcttggtcaa ggactactc cccgaaccgg tgacgggtc gtggaactca
541 ggcgcctga ccagcggcgt gcacacctc ccggctgtcc tacagtctc aggactctac
601 tcctcagca gcgtggtgac cgtgccctcc agcagcttg gcaccagac ctacatctgc
20 661 aacgtgaatc acaagcccag caacaccaag gtggacaaga gagttgagcc caaatctgt
721 gacaaaactc acacatgtcc accgtgccca gcacctgaac tcctgggggg accgtcagtc
781 ttctcttc cccaaaacc caaggacacc ctcatgatct cccggacccc tgaggtcaca
841 tgcgtggtg tggacgtgag ccacgaagac cctgaggtca agttcaactg gtacgtggac
901 ggcgtggagg tcataatgc caagacaaag ccgcgggagg agcagtaca cagcacgtac
25 961 cgtgtgtgta gcgtcctcac cgtcctgcac caggactggc tgaatggcaa ggagtacaag
1021 tgcaaggtct ccaacaaagc cctcccagcc cccatcgaga aaaccatctc caaagccaaa
1081 gggcagcccc gagaaccaca ggtgtacacc ctgccccat cccgggagga gatgaccaag
1141 aaccaggtca gcctgacctg cctggtcaaa ggcttctatc ccagcgacat cgccgtggag
1201 tgggagagca atgggagcc ggagaacaac tacaagacca cgctcccggt gctggactcc
30 1261 gacggctcct tcttctcta tagcaagctc accgtggaca agagcaggtg gcagcagggg
1321 aacgtctct catgctccgt gatgcatgag gctctgcaca accactacac gcagaagagc
1381 ctctccctgt cccgggtaa atga

(10) Seqüência de Proteína que Define a Região Variável da Cadeia Pesada de Extensão Completa de LRMR2B8HC Humanizado e a Região Constante da Cadeia Pesada de IgG1 Humana (Alótipo G1m(3)) (alelo 1) (sem seqüência de sinal) (SEQ ID Nº: 191)

5 1 qvqlvqpgae vkkpgtsvkl sckasgytft tywmhwvrqa pgqglewige inptnghtny
 61 nqkfqgratl tvdkststay melsslrsed tavyycarny vgsifdywgq glltvssas
 121 tkgpsvfpla psskstsggt aalgclvkdy fpepvtvsw n sgaltsgvht fpavllqssgl
 181 yslssvvtvp ssslgtqiyi crvnhkpsnt kvdkrvepks cdkthtcppc papellggps
 241 vflfpkpkd tlmisrtpev tcvvvdvshe dpevkfnwyv dgvevhnakt kpreeqynst
 10 301 yrvsvltvl hqdwlngkey kckvsnkalp apiektiska kgqprepvy tlppsreemt
 361 knqvsitclv kgfypsdiav ewesngqpen nykttppvld sdgsfflysk ltvdksrwqg
 421 gnvfscsvmh ealhnhytqk slslspgk

(11) Seqüência de Ácido Nucléico que Codifica a Região Variável da Cadeia Leve de LR2B8LC Humanizado (seqüência de sinal sublinhada) (SEQ ID Nº:

15 192)

1 atggaaagtc agaccctgt attcatctct attctcttt ggtgtatgg agcagacggc
 61 gacattgtga tgaccaatc ccccgatagt atggccatga gtgtaggaga aagagtcacc
 121 ctaattgca aagcctccga aatgtcgtt tcatatgtgt ctggatca acaaaaaccc
 181 ggccaatcac ccaaactct catatacggc gctcaaca gaaacacagg cgttcccgac
 20 241 agatttagtg gatccggatc agctacagat taccctta ccatcagttc agtcaagca
 301 gaagacgtg cagactatca ttgcggacaa tctataact acccttacac attcgacaa

(12) Seqüência de Proteína que Define a Região Variável da Cadeia Leve de LR2B8LC Humanizado (sem seqüência de sinal) (SEQ ID Nº: 193)

1 divmtqspds mamsvergvt lncasenvv syvswyqqk gqspklliyg asnrntgvpd
 25 61 rfsqgsatd ftiltssvqa edvadyhcgq synpytfgq gtleik

(13) Seqüência de Ácido Nucléico que Codifica a Região Constante da Cadeia Kappa Humana (alótipo Km(3)) (alelo 1) (SEQ ID Nº: 194)

1 gtacgggtgc tgcaccatct gtctcatct tcccgccatc tgatgagcag ttgaaatctg
 61 gaactgcctc tgtgtgtgc ctgctgaata acttctatcc cagagaggcc aaagtacagt
 121 ggaaggtgga taacgcctc caatcgggta actcccagga gagtgtcaca gagcaggaca
 181 gcaaggacag cacctacagc ctacagcagca ccctgacgct gagcaaagca gactacgaga
 241 aacacaaagt ctacgcctgc gaagtcaccc atcaggcct gagctcgccc gtcacaaaga

301 gcttcaacag gggagagtgt tag(14) Seqüência de Proteína que Define a Região Constante da Cadeia Kappa Humana (alótipo Km(3)) (alelo 1) (SEQ ID Nº: 195). O primeiro aminoácido é derivado da tradução do último nucleotídeo da região variável e dos dois nucleotídeos do início da seqüência da Cadeia Leve Kappa.

1 rvaapsvfi fppsdeqlks gtasvvclln nfybreakvq wkvdnalqsg nsqesvteqd
61 skdstyslss titlskadye khkvyacevt hqglsspvtk sfrngec

(15) Seqüência de Ácido Nucléico que Codifica a Região Variável da Cadeia Leve de Extensão Completa de LR2B8LC Humanizado e a Região Constante da Cadeia Kappa Humana (alótipo Km(3)) (alelo 1) (SEQ ID Nº: 196)

1 atggaagtc agaccctgt attcatctct attctcttt ggttqtatgg agcagacggc
61 gacattgtga tgaccaatc cccgatagt atggccatga gtgtaggaga aagagtcacc
121 ctaattgca aagcctccga aatgtcgtt tcatatgtgt ctggtatca acaaaaacc
181 ggccaatcac ccaaactct catatacggc gcttcaaaca gaaacacagg cgtcccgc
15 241 agatttagtg gatccgatc agctacagat tcaccctta ccatcagttc agtcaagca
301 gaagacgttg cagactatca ttgcgacaa tctataact accctacac attcggacaa
361 ggaaccaaac tcgaaattaa acgtacgggt gctgcacat ctgtctcat ctcccgc
421 tctgatgagc agtgaaatc tggaaactgcc tctgtgtgt gcctgctgaa taacttctat
481 cccagagagg ccaaagtaca gtggaagggt gataacgccc tcaatcggg taactccag
20 541 gagagtgtca cagagcagga cagcaaggac agcacctaca gcctcagcag caccctgacg
601 ctgagcaaag cagactacga gaaacacaaa gtctacgcct gcaagtcac ccatcagggc
661 ctgagctcgc ccgtcacaaa gagctcaac aggggagagt gttag

(16) Seqüência de Proteína que Codifica a Região Variável da Cadeia Leve de Extensão Completa de LR2B8LC Humanizado e a Região Constante da Cadeia Kappa Humana (alótipo Km(3)) (alelo 1) (SEQ ID Nº: 197)

1 divmtqspds mamsvgervt Inckasenvv syvswyqqkp gqspklliyg asnrntgvpd
61 rfsqsgsatd ftiltssvqa edvadyhcgq synypyftgq gtkleikrtv aapsvfifpp
121 sdeqlksgta svcllnnfy breakvqwkvdnalqsgnsq esvteqdskd styslssltt
181 lskadyekhk vyacevthqg lsspvtksfn rgec

(17) Seqüência de Ácido Nucléico que Codifica a Região Variável da Cadeia Leve de LRMR2B8LC Humanizado (seqüência de sinal sublinhada) (SEQ ID Nº: 198)

1 atggaatccc aaacccttgt tttcatctct atccttctct ggctttatgg cgccgacgga
 5 61 gacatcgtaa tgacacaatc cctgactct ctgctatga gctgggcca acgagtaaca
 121 ctaactgca aagcatccga aaatgctgta tcttacgtat cctggtatca gcaaaaacct
 181 ggtcaaagtc ctaaactct tatatatggt gcaagtaatc gtgaaagtgg cgcccagac
 241 agatttagcg gtcagggtc agcaactgac ttacactta caatttctag cgctcaggcc
 301 gaagacgttg cagactatca ttgtggacaa tcttataact atccttatac ttccggacaa
 10 361 ggcactaac tgaaattaa ac

(18) Seqüência de Proteína que Define a Região Variável da Cadeia Leve de LRMR2B8LC Humanizado (sem seqüência de sinal) (SEQ ID Nº: 199)

1 divmtqspds lamslgervt lncasenvv syvswyqqkp gqspklliyg asn-
 resgvpd
 15 61 rfsqgsatd flltissvqa edvadyhcgq synpytfgq gtleik

(19) Seqüência de Ácido Nucléico que Codifica a Região Variável da Cadeia Leve de Extensão Completa de LRMR2B8LC Humanizado e a Região Constante da Cadeia Kappa Humana (alótipo Km(3)) (alelo 1) (seqüência de sinal sublinhada) (SEQ ID Nº: 200)

20 1 atggaatccc aaacccttgt tttcatctct atccttctct ggctttatgg cgccgacgga
 61 gacatcgtaa tgacacaatc cctgactct ctgctatga gctgggcca acgagtaaca
 121 ctaactgca aagcatccga aaatgctgta tcttacgtat cctggtatca gcaaaaacct
 181 ggtcaaagtc ctaaactct tatatatggt gcaagtaatc gtgaaagtgg cgcccagac
 241 agatttagcg gtcagggtc agcaactgac ttacactta caatttctag cgctcaggcc
 25 301 gaagacgttg cagactatca ttgtggacaa tcttataact atccttatac ttccggacaa
 361 ggcactaac tgaaattaa acgtacggtg gctgcacat ctgttctcat ctcccgcga
 421 tctgatgagc agttgaaatc tggaaactgcc tctgtgtgt gctgctgaa taacttctat
 481 cccagagagg ccaaagtaca gtggaaggtg gataacgccc tccaatcggg taactcccag
 541 gagagtgtca cagagcagga cagcaaggac agcacctaca gcctcagcag caccctgacg
 30 601 ctgagcaaag cagactacga gaaacacaaa gtctacgct gcaagtcac ccatcagggc
 661 ctgagctcgc ccgtcacaaa gagctcaac aggggagagt gttag

(20) Seqüência de Proteína que Define a Região Variável da Cadeia Leve de Extensão Completa de LRMR2B8LC Humanizado e a Região Constante da Cadeia Kappa Humana (alótipo Km(3)) (alelo 1) (SEQ ID N°: 201)

1 divmtqspds lamslgervt lncasenvv syvswyqqkp gqspklliyg asnresgvpd
 5 61 rfsqgsatd fltissvqa edvadyhcgq synypytfqg gtleikrtv aapsvfifp
 121 sdeqlksqta svvcllnfy preakvqkv dnalqsgnsq esvteqdskd styslsstt
 181 lskadyekhk vyacevthqg lsspvtkfn rgec

Para conveniência, a Tabela 14 fornece um quadro de concor-
 dância mostrando a correspondência entre as seqüências de extensão com-
 10 pleta e os anticorpos discutidos nesta seção com aqueles apresentados na
 Listagem de Seqüência.

TABELA 14

SEQ. ID N°:	Proteína ou Ácido Nucléico
182	Região Variável da Cadeia Pesada de LR2B8HC– ácido nucléico
183	Região Variável da Cadeia Pesada de LR2B8HC– proteína
184	Região Constante da Cadeia Pesada de IgG1 Humana (Alótipo G1m(3)) (alelo 1) – ácido nucléico
185	Região Constante da Cadeia Pesada de IgG1 Humana (Alótipo G1m(3)) (alelo 1) – proteína
186	LR2B8HC + Constante de IgG1 (Alótipo G1m(3)) (alelo 1) – ácido nucléico
187	LR2B8HC + Constante de IgG1 (Alótipo G1m(3)) (alelo 1) – proteína
188	LRMR2B8HC Região Variável da Cadeia Pesada – ácido nucléico
189	LRMR2B8HC Região Variável da Cadeia Pesada – proteína
190	LRMR2B8HC + Constante de IgG1 (Alótipo G1m(3)) (alelo 1) – ácido nucléico
191	LRMR2B8HC + Constante de IgG1 (Alótipo G1m(3)) (alelo 1) – proteína
192	Região Variável da Cadeia Leve de LR2B8LC – ácido nucléico
193	Região Variável da Cadeia Leve de LR2B8LC – proteína
194	Região Constante da Cadeia Kappa Humana (Alótipo Km(3)) (alelo 1) – ácido nucléico
195	Região Constante da Cadeia Kappa Humana (Alótipo Km(3)) (alelo 1) – proteína
196	LR2B8LC + Constante Kappa (Alótipo Km(3)) (alelo 1) – ácido nucléico

SEQ.	Proteína ou Ácido Nucléico
ID Nº:	
197	LR2B8LC + Constante Kappa (Alótipo Km(3)) (alelo 1) – proteína
198	Região Variável da Cadeia Leve de LRMR2B8LC– ácido nucléico
199	Região Variável da Cadeia Leve de LRMR2B8LC– proteína
200	LRMR2B8LC + Constante Kappa (Alótipo Km(3)) (alelo 1) – ácido nucléico
201	LRMR2B8LC + Constante Kappa (Alótipo Km(3)) (alelo 1) – proteína

A Tabela 15 resume as seqüências de CDR da cadeia pesada (definição de Kabat) dos anticorpos 2B8 humanizados preparados pelo procedimento de humanização 1 e pelo procedimento de humanização 2 descritos acima neste Exemplo.

5 TABELA 15

Anticorpo	CDR1	CDR2	CDR3	Região Variável da Cadeia Pesada de Extensão Completa
Pesada de 2B8 de Murino	TYWMH (SEQ ID Nº: 15)	EINPTNGHTNYNEKFKS (SEQ ID Nº: 16)	NYVGSIFDY (SEQ ID Nº: 17)	SEQ ID Nº: 12
Hu2B8 Hv1f.1	TYWMH (SEQ ID Nº: 15)	EINPTNGHTNYNEKFQG (SEQ ID Nº: 202)	NYVGSIFDY (SEQ ID Nº: 17)	SEQ ID Nº: 159
Hu2B8 Hv5a.1	TYWMH (SEQ ID Nº: 15)	EINPTNGHTNYNPSFQG (SEQ ID Nº: 203)	NYVGSIFDY (SEQ ID Nº: 17)	SEQ ID Nº: 165
Hu2B8 Hv5-51.1	TYWMH (SEQ ID Nº: 15)	EINPTNGHTNYNPSFQG (SEQ ID Nº: 203)	NYVGSIFDY (SEQ ID Nº: 17)	SEQ ID Nº: 169
LR2B8HC	TYWMH (SEQ ID Nº: 15)	EINPTNGHTNYNEKFKG (SEQ ID Nº: 204)	NYVGSIFDY (SEQ ID Nº: 17)	SEQ ID Nº: 183
LRMR2B8HC	TYWMH (SEQ ID Nº: 15)	EINPTN- GHTNYNQKFG (SEQ ID Nº: 205)	NYVGSIFDY (SEQ ID Nº: 17)	SEQ ID Nº: 189

A Tabela 16 resume as seqüências de CDR da cadeia leve (definição de Kabat) dos anticorpos 2B8 humanizados preparados pelo proce-

dimento de humanização 1 e pelo procedimento de humanização 2 descritos acima neste Exemplo

TABELA 16

Anticorpo	CDR1	CDR2	CDR3	Região Variável da Cadeia Leve de Extensão Completa
Leve de 2B8 de Murino	KASENVVSYVS (SEQ ID Nº: 18)	GASNRNT (SEQ ID Nº: 19)	GQSYNYPYT (SEQ ID Nº: 20)	SEQ ID Nº: 14
Hu2B8 Kv1-39.1	KASENVVSYVS (SEQ ID Nº: 18)	GASNRNT (SEQ ID Nº: 19)	GQSYNYPYT (SEQ ID Nº: 20)	SEQ ID Nº: 173
Hu2B8 Kv3-15.1	KASENVVSYVS (SEQ ID Nº: 18)	GASNRNT (SEQ ID Nº: 19)	GQSYNYPYT (SEQ ID Nº: 20)	SEQ ID Nº: 179
LR2B8LC	KASENVVSYVS (SEQ ID Nº: 18)	GASNRNT (SEQ ID Nº: 19)	GQSYNYPYT (SEQ ID Nº: 20)	SEQ ID Nº: 193
LRMR2B8LC	KASENVVSYVS (SEQ ID Nº: 18)	GASNRES (SEQ ID Nº: 206)	GQSYNYPYT (SEQ ID Nº: 20)	SEQ ID Nº: 199

C. Afinidade de Ligação de Anticorpos 2B8 Humanizados

5 A afinidade de ligação ao antígeno e a cinética de interação foram analisadas por tecnologia de ressonância de plásmon de superfície usando um instrumento BIAcore T100. Imunoglobulinas anti-humano de camundongo (Jackson ImmunoResearch Labs, 209-005-098) foram imobilizadas em chips sensores de dextran carboximetilado CM4 (BIAcore, Nº de Catálogo BR-1005-34) por acoplamento de amina (BIAcore, Nº de Catálogo BR-1000-50) usando um protocolo de acoplamento usual de acordo com as recomendações do fabricante. As análises foram executadas a 25°C usando PBS (GIBCO, Nº de Catálogo 14040-133) contendo 0,05% de tensoativo P20 (BIAcore, Nº de Catálogo BR-1000-54), 2 mg/mL de BSA (EMD, Nº de Catálogo 2930) e 10 mg/mL de Sal de Sódio CM-Dextran (Fluka, Nº de Catálogo 86524) como tampão de corrida.

Os anticorpos foram capturados em uma célula de fluxo individual em uma taxa de fluxo de 10 μ L/min. O tempo de injeção foi variável para cada anticorpo para produzir aproximadamente 20 RU de anticorpo

capturado para cada ciclo. Tampão ou HGF (R&D Systems, Nº de Catálogo 294-HGN-025) diluído em tampão de corrida foi injetado seqüencialmente sobre uma superfície de referência (nenhum anticorpo capturado) e sobre a superfície ativa (anticorpo a ser testado) por 2 minutos a 60 μ L/min. A fase de dissociação foi monitorada por 15 ou 90 minutos, dependendo da concentração. A superfície foi então regenerada com 10 mM de Glicina-HCl, pH 1,7 (BIAcore, Nº de Catálogo BR-1003-54) injetada por 3 minutos em uma taxa de fluxo de 60 μ L/min antes de outro ciclo ser iniciado. As concentrações de HGF testadas foram 1,88; 3,75 e 7,5 nM. A determinação dos parâmetros de cinética foi obtida usando a função de cinética do programa BIAevalutativon com subtração da referência. Os parâmetros de cinética para cada anticorpo k_a (constante da taxa de associação), k_d (constante da taxa de dissociação) e K_D (constante de dissociação de equilíbrio) estão resumidos na Tabela 8.

Os resultados resumidos na Figura 8 mostram que certas combinações de cadeias pesadas super-humanizadas (Hu2B8 Hv5a.1, Hu2B8 Hv5-51.1 ou Hu2B8 Hv1-f.1) e cadeias leves (Hu2B8 Kv1-39.1 ou Hu2B8 Kv3-15.1) retêm afinidade de ligação (K_D) a HGF semelhante a 2B8 quimérico (regiões variáveis de camundongo com regiões constantes humanas) e 2B8 (Tabela 5).

D. Ensaio de ligação mutuamente exclusiva

A ligação mutuamente exclusiva a HGF foi avaliada por tecnologia de ressonância de plásmom de superfície usando um instrumento BIAcore T100. Imunoglobulinas anti-humanas de camundongo (Jackson Immuno-Research Labs, 209-005-098) foram imobilizadas em foram imobilizadas sobre chips sensores CM5 de dextran carboxiladometilado (BIAcore, Nº de Catálogo BR-1006-68) por acoplamento de amina (BIAcore, Nº de Catálogo BR-1000-50) usando um protocolo usual de acoplamento de acordo com as recomendações do fabricante. As análises foram realizadas a 25°C usando PBS (GIBCO, Nº de Catálogo 14040-133) contendo 0,05% de tensoativo P20 (BIAcore, Nº BR-1000-54), 2 mg/mL de BSA (EMD, Nº de Catálogo 2930), e 10 mg/mL de Sal de Sódio CM-Dextran (Fluka, Nº de Catálogo

86524) como tampão de corrida.

Os anticorpos foram capturados em uma célula de fluxo individual em uma taxa de fluxo de 30 μ L/min. O tempo de injeção foi variável para cada anticorpo para produzir aproximadamente 150 RU de anticorpo capturado para cada ciclo. HGF (R&D Systems, N^o de Catálogo 294-HGN-025) diluído em tampão de corrida em uma concentração final de 7,5 μ g/mL foi injetado por 90 segundos a 30 μ L/min sobre os anticorpos humanizados capturados. A ligação de HGF foi monitorada antes da injeção subsequente de anticorpo 2B8 de camundongo ou anticorpo policlonal anti-HGF de cabra (R & D Systems, AF294) por 3 min a 30 μ L/min. A superfície foi então regenerada com 10 mM de Glicina-HCl pH 2,0 (BIAcore, N^o de catálogo BR-1003-55) injetada por 3 min em uma taxa de fluxo de 60 μ L/min antes de outro anticorpo ser testado. Os resultados estão resumidos na Figura 9.

Os resultados resumidos na Figura 9 mostram que tanto os anticorpos 2B8 humanizados quanto os anticorpos 2B8 quiméricos impedem 2B8 de se ligar a HGF. Estes resultados demonstram que os anticorpos humanizados ainda se ligam ao mesmo epítipo de HGF que o anticorpo 2B8 original.

Exemplo 13 – Produção de Variantes Humanizadas de 2B8

20 a. ANTICORPOS HUMAN ENGINEERED™

Cadeias manipuladas leves (LR2B8LC e LRMR2B8LC, respectivamente) e pesadas (LR2B8HC and LRMR2B8HC, respectivamente) de baixo risco e de risco baixo-mais-moderado com otimização de códon e de expressão foram clonadas *in phase* em vetores de expressão de anticorpo transitório de XOMA, os quais contêm módulos de regiões constantes humanas Kappa e Gama-1. As quatro variantes de 2B8 Human Engineered foram produzidas por transfecção transitória em células HEK293E. Os quatro anticorpos a seguir foram produzidos:

HE2B8-1 = LR2B8HC (+ região constante de IgG1 (alótipo G1m(3) (alelo 1))) (SEQ ID N^o: 187) mais LR2B8LC (+ região constante Kappa (alótipo Km(3) (alelo 1))) (SEQ ID N^o: 197)

HE2B8-2 = LR2B8HC (+região constante de IgG1 (alótipo

G1m(3) (alelo 1)) (SEQ ID N°: 187) mais LRMR2B8LC (+ Região constante Kappa (alótipo Km(3) (alelo 1))) (SEQ ID N°: 201)

HE2B8-3 = LRMR2B8HC (+ região constante de IgG1 (alótipo G1m(3) (alelo 1)) (SEQ ID N°: 191) mais LR2B8LC (+ Região constante Kappa (alótipo Km(3) (alelo 1))) (SEQ ID N°: 197)

HE2B8-4 = LRMR2B8HC (+ região constante de IgG1 (alótipo G1m(3) (alelo 1)) (SEQ ID N°: 191) mais LRMR2B8LC (+ Região constante Kappa (alótipo Km(3) (alelo 1))) (SEQ ID N°: 201)

As cadeias leves e pesadas foram co-transfectadas em células HEK293E adaptadas para suspensão de XOMA cultivadas em meio IS293 (Irvine Scientific, Irvine, CA) usando frascos de agitação de 2 litros. Após 24 horas nos frascos de agitação, 200 mL das células transfectadas foram centrifugadas, ressuspensas em 40 mL de meio fresco e transferidas para frascos Integra (Wilson Wolf Manufacturing Inc., MN) para produção. Após a incubação por sete dias, as suspensões celulares foram removidas dos frascos Integra, centrifugadas e os sobrenadantes das culturas retidos. Os anticorpos nos sobrenadantes das culturas foram purificados em colunas de rotação (spin) de proteína A (Pro-Chem), dialisados contra PBS, concentrados e esterilizados por filtração.

b. Anticorpos SUPERHUMANIZED™

cDNA de Hu2B8_Hv5-51.1 de extensão completa + domínio constante de IgG1 humana (alótipo G1m(3)) foi clonado em pEE6.4 (Lonza Biologics, Berkshire, UK) usando sítios de restrição de HindIII e EcoRI. cDNA da região variável de Hu2B8_Kv1-39.1 de extensão completa + domínio constante Kappa humano e cDNA da região variável de Hu2B8_Kv3-15.1 de extensão completa + domínio constante Kappa humano foram clonados cada, em pEE14.4 (Lonza Biologics) usando sítios de restrição de HindIII e EcoRI. cDNA do promotor de hCMV-MIE + Hu2B8_Hv5-51.1 de extensão completa + domínio constante de IgG1 humana (alótipo G1m(3)) + fragmento poli A de SV40 (em pEE6.4) foi removido por digestão com NotI/Sall e inserido no vetor pEE14.4 da cadeia Kappa através dos sítios de NotI/Sall, criando assim 2 diferentes vetores de expressão que expressam cada, si-

multaneamente, a cadeia pesada e a cadeia leve para fazer os seguintes anticorpos:

sh2B8-9 (G1m(3)) = hu2B8 Hv5-51.1 (+ Região constante de IgG1 (alótipo G1m(3)) (alelo 2)) (SEQ ID N°: 210) mais hu2B8 Kv 1-39.1 (+ Região constante Kappa (alótipo Km(3)) (alelo 2))) (SEQ ID N°: 177)

sh2B8-12 (G1m(3)) = hu2B8 Hv5-51.1 (+ Região constante de IgG1 (alótipo G1m(3)) (alelo 2)) (SEQ ID N°: 210) mais hu2B8 Kv 3-15.1 (+ Região constante Kappa (Km(3)) alótipo (alelo 2))) (SEQ ID N°: 181)

As seqüências de ácido nucléico codificantes e as seqüências de proteína que definem a Região Constante da Cadeia Pesada de IgG1 Humana alótipo G1m(3) (alelo 2) e cada uma das seqüência da cadeia pesada de extensão completa são descritas abaixo. As seqüências da cadeia leve foram as mesmas que as descritas no Exemplo 12.

(1) Seqüência de Ácido Codificante da Região Constante da Cadeia Pesada de IgG1 Humana (alótipo G1m(3)) (alelo 2) (SEQ ID N°: 207)

1 cctccaccaa gggcccatcg gtcttcccc tggcaccctc ctccaagagc acctctgggg
 61 gcacagcggc cctgggctgc ctggtcaagg actacttccc cgaaccggtg acggtgtcgt
 121 ggaactcagg cgccctgacc agcggcgctgc acaccttccc ggctgtccta cagtcctcag
 181 gactctactc cctcagcagc gtggtgaccg tgccctccag cagcttgggc accagacct
 20 241 acatctgcaa cgtgaatcac aagcccagca acaccaaggt ggacaagaga gttgagccca
 301 aatcttgtga caaaactcac acatgcccac cgtgcccagc acctgaactc ctggggggac
 361 cgtcagtctt cctcttcccc ccaaaacca aggacaccct catgatctcc cggaccctg
 421 aggtcacatg cgtggtggtg gacgtgagcc acgaagacc tgaggtcaag ttaactggt
 481 acgtggacgg cgtggaggtg cataatgcca agacaaagcc gcgggaggag cagtacaaca
 25 541 gcacgtaccg tgtggtcagc gtctcaccg tctgcacca ggactggctg aatggcaagg
 601 agtacaagtg caaggtctcc acaaagccc tccagcccc catcgagaag accatctcca
 661 aagccaaagg gcagccccga gaaccacagg tgtacaccct gccccatcc cgggaggaga
 721 tgaccaagaa ccaggtcagc ctgacctgcc tggtaaagg ctctatccc agcgacatcg
 781 ccgtggagtg ggagagcaat gggcagccgg agaacaacta caagaccag cctcccgtgc
 30 841 tggactccga cggctcctc ttctctaca gcaagctcac cgtggacaag agcaggtggc
 901 agcaggggaa cgtcttctca tgctccgtga tgcatgaggc tctgcacaac cactacacgc
 961 agaagagcct ctccctgtct ccgggtaaat ga

(2) Seqüência de Proteína que Define a da Região Constante da Cadeia Pesada de IgG1 Humana (alótipo G1m(3)) (alelo 1 ou 2) (SEQ ID Nº: 208). O primeiro aminoácido é derivado da tradução do último nucleotídeo da região variável e dos dois nucleotídeos do início da Seqüência da Cadeira Pesada de IgG1.

5

1 astkgpsvfp lapsskstsg gtaalgclvk dyfpepvtvs wnsгалtsgv htfpavlqss
 61 gylslssvvt vpssslgtqt yicnvnhkps ntkvdkrvep kscdkthtcp pcpapellgg
 121 psvflfppkp kdtlmisrtp evtcvvvdvs hedpevkfnw yvdgvevhna ktkpreeqyn
 181 styrvsvlt vlhqdwlngk eykckvsnka lpapiektis kakgqprepq vytlppsree
 241 mtknqvsltc lvkgfypsdi avewesngqp ennyktpv ldsdgsffly skltvdksrw
 301 qqgnvfscsv mhealhnhyt qkslslspgk

10

(3) Seqüência de Ácido Codificante da Cadeia de Extensão Completa que contém a Região Variável da Cadeia Pesada de Hu2B8 Hv5-51.1 Humanizado e a Região Constante da Cadeia Pesada de IgG1 Humana G1m(3) alótipo (alelo 2) (seqüência de sinal sublinhada) (SEQ ID Nº: 209)

15

1 atggggtaa ccgccatcct cgcctctc ctggctgttc tccaaggagt ctgtgccgaa
 61 gtgcactgg tgcagtctgg agcagagggt aaaaagcccg gggagtctct gaagatctcc
 121 tgtaagggtt ctggatacag cttaccacc tactggatgc actgggtgcg ccagatgccc
 181 gggaaaggcc tggagtggat gggggagatt aatcctacca acggtcatac taactacaat
 241 ccgtcctcc aaggccaggc caccatctca gctgacaagt ccatcagcac tgctactctg
 301 cagtggagca gctgaaggc ctcggacacc gccatgtatt actgtgagag aaactatgtt
 361 ggtagcatct tgactactg gggccaagga accctggta cgtctcctc agcctccacc
 421 aagggccat cggctctccc cctggcacc cctccaaga gcacctctgg gggcacagcg
 481 gccctgggct gctgtgcaa ggactactc cccgaaccgg tgacgggtgc gtggaactca
 541 ggcgcctga ccagcggcgt gcacacctc cgggctgtcc tacagtctc aggactctac
 601 tccctcagca gcgtggtag cgtgccctcc agcagcttg gcaccagac ctacatctgc
 661 aacgtgaatc acaagcccag caacaccaag gggacaaga gaggtagcc caaatctgt
 721 gacaaaactc acacatgcc accgtgccc gcacctgaac tctgggggg accgtcagtc
 781 ttctcttc cccaaaacc caaggacacc ctcatgatct cccggaccc tgaggtcaca
 841 tgcgtggagg tggacgtgag ccacgaagac cctgaggta agttcaactg gtacgtggac
 901 ggcgtggagg tgcataatgc caagacaaag ccgcgaggagg agcagtacaa cagcacgtac
 961 cgtgtggta gcgtcctcac cgtctgcac caggactggc tgaatggcaa ggagtacaag

20

25

30

1021 tgcaaggtct ccaacaaagc cctcccagcc cccatcgaga agaccatctc caaagccaaa
 1081 gggcagcccc gagaaccaca ggtgtacacc ctgccccat cccgggagga gatgaccaag
 1141 aaccaggtca gcctgacctg cctgttcaaa ggcttctatc ccagcgacat cgccgtggag
 1201 tgggagagca atgggcagcc ggagaacaac tacaagacca cgctcccgt gctggactcc
 5 1261 gacggctct tcttctcta cagcaagctc accgtggaca agagcaggtg gcagcagggg
 1321 aacgtctct catgctccgt gatgcatgag gctctgcaca accactacac gcagaagagc
 1381 ctctccctgt ctccgggtaa atga

10 (4) Seqüência de Proteína que Define a Cadeia de Extensão Completa que contém Hu2B8 Hv5-51.1 Humanizado e a Região Constante da Cadeia Pesada de IgG1 Humana G1m(3) alótipo (alelo 2) (sem seqüência de sinal) (SEQ ID Nº: 210)

1 evqlvqsgae vkkpgeslki sckgsgysft tywmhwvvrqm pgkglewmge inptnghtny
 61 npsfqqvvti sadksistay lqwsslkasd tamyycarny vgsifdywgq gtlvtvssas
 121 tkgpsvfpla psskstsggt aalgclvkdy fpepvtvswn sgaltsgvht fpavlvqssgl
 15 181 yslssvvtvp ssslgtqtyi cnvnhkpsnt kvdkrvepks cdkthtccppc papellggps
 241 vllfppkpkd tlmisrtpev tcvvvdvshe dpevkfnwyv dgvevhnakt kpreeqynst
 301 yrvsvltvl hqdwingkey kckvsnkalp apiektiska kgqprepvy tlppsreemt
 361 knqvsltclv kgfypsdiav ewesngqpen nykttppvld sdgsfflysk ltvdksrwqq
 421 gnvfscsvmh ealhnhytqk slslspgk

20 Cada vetor de expressão duplo foi transfectado em células 293T para expressão transitória usando DMEM com 10% de soro fetal bovino. Quarenta e oito horas após a transfecção, as células foram lavadas com, e então substituídas por, meio livre de soro, IS GRO™ (Irvine Scientific, Santa Ana, CA) contendo 4mM de L-Glutamina. O sobrenadante foi coletado diari-
 25 amente e substituído por meio fresco por 10 dias. Os sobrenadantes da cultura foram centrifugados, filtrados (0,45 µm) e concentrados 10 a 100 vezes. Os anticorpos foram purificados em resina ProSep vA (Millipore), dialisados contra PBS, concentrados e esterilizados por filtração.

Exemplo 14 – Características de Ligação de Variantes Humanizadas de 2B8

30 Os anticorpos humanizados produzidos no Exemplo 13 foram caracterizados quanto a sua habilidade de se ligar a hHGF e às proteínas HGF recombinantes produzidos na Exemplo 13.

Os anticorpos foram analisados por ressonância de plásmon de superfície usando um instrumento BIAcore T100 para avaliar sua habilidade de se ligar a hHGF e às proteínas de fusão discutidas no Exemplo 3. Cada anticorpo foi imobilizado sobre um chip sensor de dextran carboximetilado

5 CM5 (BIAcore, Nº de Catálogo BR-1006-68) por acoplamento de amina (BIAcore, Nº de Catálogo BR-1000-50) usando um protocolo de acoplamento usual de acordo com as instruções do fabricante.

As análises foram realizadas a 25°C usando PBS (GIBCO, Nº de Catálogo 14040-133) contendo 0,05% de tensoativo P20 (BIAcore, Nº de

10 Catálogo R-1000-54), 2 mg/mL de BSA (EMD, Nº de Catálogo 2930) e 10 mg/mL de sal de sódio CM-Dextran (Fluka, Nº de Catálogo 86524) como tampão de corrida. O sobrenadante contendo diferentes proteínas de fusão de HGF ou o sobrenadante de células transfectadas com o vetor vazio foi injetado sobre cada anticorpo em uma taxa de fluxo de 30 μ L/min por 3 mi-

15 nutos. A ligação resultante foi determinada como unidades de ressonância (RU) sobre o limite basal 30 segundos após o final da injeção. A ligação foi comparada a HGF humano (R&D Systems, Nº de Catálogo 294-HGN-025) diluído em tampão de corrida. As ligações inespecíficas foram monitoradas por comparar a ligação a uma superfície de controle. Os resultados estão

20 resumidos na Tabela 17.

TABELA 17

Anticorpo	rhHGF (R&D Systems)	rhHGF (R&D Systems)	Quimera MHM (495-585)	Quimera MHM (507-585)	Quimera MHM (499-556)
2B8	Sim	Não	Sim	Sim	Sim
HE2B8-1	Sim	Não	Sim	Sim	Sim
HE2B8-2	Sim	Não	Sim	Sim	Sim
HE2B8-3	Sim	Não	Sim	Sim	Sim
HE2B8-4	Sim	Não	Sim	Sim	Sim
sh2B8-9 (G1m(3))	Sim	Não	Sim	Sim	Sim
sh2B8-12 (G1m(3))	Sim	Não	Sim	Sim	Sim

Os resultados na Tabela 17 demonstram que cada um dos anticorpos humanizados baseados em 2B8 se liga a rhHGF e a todas as três quimeras camundongo-humano-camundongo.

Exemplo 15 – Afinidades de Ligação de Variantes Humanizadas de 2B8

5 As afinidades de ligação e a cinética de interação dos anticorpos listados na Tabela 15 foram medidas por ressonância de plásmon de superfície.

Imunoglobulinas anti-humano de camundongo (Jackson Labs, N^o de Catálogo 209-005) foram imobilizadas em chips sensores de dextran carboximetilado CM4 (BIAcore, N^o de Catálogo BR-1006-68) por acoplamento de amina (BIAcore, N^o de Catálogo BR-1000-50) usando um protocolo de acoplamento usual de acordo com as instruções do fabricante. As análises foram realizadas a 25°C usando PBS (GIBCO, N^o de Catálogo 14040-133) contendo 0,05% de tensoativo P20 (BIAcore, N^o de Catálogo BR-1000-54), e 15 2 mg/mL de BSA (EMD, N^o de Catálogo 2930).

Os anticorpos foram capturados em uma célula de fluxo individual em uma taxa de fluxo de 10 µL/min. O tempo de injeção foi variável para cada anticorpo para produzir aproximadamente 20 RU de anticorpo capturado para cada ciclo. Tampão ou HGF (R&D Systems, N^o de Catálogo 294-HGN-025) diluído em tampão de corrida foi injetado seqüencialmente sobre 20 uma superfície de referência (nenhum anticorpo capturado) e sobre a superfície ativa (anticorpo a ser testado) por 2 minutos a 60 µL/min. A fase de dissociação foi monitorada por 15 ou 90 minutos, dependendo da concentração. A superfície foi então regenerada com 10 mM de Glicina-HCl, pH 1,7 25 (BIAcore, N^o de Catálogo BR-1003-54) injetada por 3 minutos em uma taxa de fluxo de 60 µL/min antes de outro ciclo ser iniciado. As concentrações de HGF testadas foram 0,46 nM a 7,5 nM.

Os parâmetros de cinética foram determinados usando a função de cinética do programa BIAevaluation[®] com subtração da referência. Os parâmetros de cinética para cada anticorpo k_a (constante da taxa de associação), k_d (constante da taxa de dissociação) e K_D (constante de dissociação de equilíbrio) estão resumidos na Tabela 18. 30

TABELA 18

Anticorpo	k_a (1/Ms)	k_d (1/s)	K_D (pM)	SD
2B8	$1,4 \times 10^6$	$1,0 \times 10^{-5}$	7,3	-
HE2B8-1	$2,2 \times 10^6$	$1,4 \times 10^{-5}$	7,1	5,2
HE2B8-2	$1,8 \times 10^6$	$9,6 \times 10^{-6}$	5,2	2,7
HE2B8-3	$2,0 \times 10^6$	$4,1 \times 10^{-6}$	2,0	1,1
HE2B8-4	$1,7 \times 10^6$	$1,1 \times 10^{-5}$	6,5	1,3
sh2B8-9 (G1m(17,1))	$2,0 \times 10^6$	$1,7 \times 10^{-5}$	8,1	5,3
sh2B8-12 (G1m(17,1))	$1,9 \times 10^6$	$2,3 \times 10^{-5}$	12	0,4

Estes dados mostram que os anticorpos humanizados têm taxas de associação rápidas (k_a), taxas de dissociação muito lentas (k_d), e afinidades muito altas (K_D). Em particular, os anticorpos têm afinidades que variam de 2,0 a 12 pM.

Exemplo 16 – Comparação das Afinidades de Ligação a 25°C e 37°C

As afinidades de ligação e a cinética de interação dos anticorpos HE2B8-4, sh2B8-9, sh2B8-12, e 2B8 murino foram medidas por ressonância de plásmen de superfície sob diferentes condições.

Imunoglobulinas anti-humano de camundongo (Jackson Labs, Nº de Catálogo 209-005) ou imunoglobulinas anti-camundongo de coelho (BIAcore, Nº de Catálogo BR-1005-14) foram imobilizadas em chips sensores de dextran carboximetilado CM4 (BIAcore, Nº de Catálogo BR-1006-68) por acoplamento de amina (BIAcore, Nº de Catálogo BR-1000-50) usando um protocolo de acoplamento usual de acordo com as instruções do fabricante. No caso de medidas a 25°C para sh2b8-9 e sh2B8-12, um chip sensor CM5 (BIAcore, Nº de Catálogo BR-1006-68) foi usado. As análises foram realizadas a 25°C e 37°C usando PBS (GIBCO, Nº de Catálogo 14040-133) contendo 0,05% de tensoativo P20 (BIAcore, Nº de Catálogo BR-1000-54), e 2 mg/mL de BSA (EMD, Nº de Catálogo 2930) como tampão de corrida.

Os anticorpos foram capturados em uma célula de fluxo individual em uma taxa de fluxo de 10 μ L/min. O tempo de injeção foi variável para cada anticorpo para produzir aproximadamente 20 RU de anticorpo capturado para cada ciclo. Tampão ou HGF (R&D Systems, Nº de Catálogo 294-

HGN-025) diluído em tampão de corrida foi injetado seqüencialmente sobre uma superfície de referência (nenhum anticorpo capturado) e sobre a superfície ativa (anticorpo a ser testado) por 2 minutos a 60 $\mu\text{L}/\text{min}$. A fase de dissociação foi monitorada por 15 ou 90 minutos, dependendo da concentração. A superfície dos chips sensores de imunoglobulinas de camundongo anti-humano foi então regenerada com 10 mM de Glicina-HCl, pH 2,2 (BIAcore, N^o de Catálogo BR-1003-54) injetada por 3 minutos em uma taxa de fluxo de 60 $\mu\text{L}/\text{min}$ antes de outro ciclo ser iniciado. A superfície dos chips sensores de imunoglobulinas de coelho anti-camundongo foi então regenerada com 10 mM de Glicina-HCl, pH 1,7 (BIAcore, N^o de Catálogo BR-1003-54) injetada por 3 minutos em uma taxa de fluxo de 60 $\mu\text{L}/\text{min}$ antes de outro ciclo ser iniciado. As concentrações de HGF testadas foram 0,46 nM a 7,5 nM.

Os parâmetros de cinética foram determinados usando a função de cinética do programa BIAevaluation com subtração da referência. Os parâmetros de cinética para cada anticorpo, k_a (constante da taxa de associação), k_d (constante da taxa de dissociação) e K_D (constante de dissociação de equilíbrio) estão resumidos na Tabela 19.

TABELA 19

Anticorpo	Temp. (°C)	k_a (1/Ms)	k_d (1/s)	K_D (pM)
2B8	25	$1,6 \times 10^6$	$2,1 \times 10^{-5}$	13,5
2B8	37	$2,8 \times 10^6$	$1,3 \times 10^{-5}$	4,5
HE2B8-4	25	$2,0 \times 10^6$	$1,2 \times 10^{-5}$	5,6
HE2B8-4	37	$3,1 \times 10^6$	$1,0 \times 10^{-5}$	3,3
sh2B8-9 (G1m(17,1))	25	$2,0 \times 10^6$	$1,7 \times 10^{-5}$	8,1
sh2B8-9 (G1m(3))	37	$2,5 \times 10^6$	$1,4 \times 10^{-5}$	5,8
sh2B8-12 (G1m(17,1))	25	$1,9 \times 10^6$	$2,3 \times 10^{-5}$	12,0
sh2B8-12 (G1m(3))	37	$2,4 \times 10^6$	$1,1 \times 10^{-5}$	4,8

Conforme esperado, as constantes da taxa de associação aumentaram com um aumento na temperatura. De forma surpreendente, as constantes de dissociação não mudaram significativamente com um aumento correspondente na temperatura. Conseqüentemente, as constantes de

dissociação de equilíbrio gerais (K_D) foram aproximadamente 1,4 a 3 vezes menores (maior afinidade) em temperatura fisiológica (37° C).

Exemplo 17 – Atividade de Neutralização de Variantes Humanizadas de 2B8

5 Os anticorpos descritos no Exemplo 14 foram caracterizados quanto a sua habilidade de (a) inibir a ligação de hHGF a c-Met, e (b) inibir a incorporação de BrdU estimulada por HGF em células 4MBr-5.

O Ensaio de Inibição da Ligação HGF-Met (Ensaio de Neutralização) foi realizado como descrito a seguir. Os anticorpos foram testados por ELISA quanto a sua habilidade de inibir a ligação de hHGF a c-Met. Especificamente, placas de ensaio DELFIA de 96 poços Wallac (Wallac Inc., Nº de Catálogo AAAND-0001) foram revestidas com 100 µL de HGF a 6,25 µg/mL (R&D Systems, Nº de Catálogo 294-HGN-025) em tampão de revestimento de carbonato (15 mM de Na₂CO₃ e 34 mM de NaHCO₃, pH 9,0) por 16 horas a 4°C. As placas foram então bloqueadas com 200 µL de leite em pó desnatado a 5% em PBS por uma hora em temperatura ambiente. Os anticorpos foram preparados em uma placa separada por adicionar concentrações crescentes dos anticorpos sob investigação (0,033 a 250 nM, diluição seriada de duas vezes) a 2 nM de c-Met biotinilado em leite em pó desnatado a 5% em PBS. C-Met (R&D Systems, Nº de Catálogo 358-MT/CF) é biotinilado de acordo com as instruções do fabricante em uma proporção de biotina para c-Met de 10:1. 100 µL de amostra por poço foram transferidos para a placa de ensaio e incubados por duas horas em temperatura ambiente. As placas resultantes foram lavadas três vezes com PBS-0,1% de Tween 20, e incubadas por uma hora em temperatura ambiente com Estreptavidina marcada com Eu (Wallac, Nº de Catálogo 1244-360) diluída 1:1000 em tampão de ensaio DELFIA (Wallac, Nº de Catálogo 4002-0010). As placas resultantes foram lavadas 3 vezes com solução de lavagem DELFIA (Wallac, Nº de Catálogo 4010-0010) e incubadas com 100 µL/poço de solução de intensificação DELFIA (Wallac #4001-0010) por 15 minutos em temperatura ambiente com agitação. As placas foram lidas em um instrumento Victor³V (Perkin Elmer) usando o método de Európio. Os valores de IC₅₀ foram calculados e estão resumidos na Tabela 6.

Os valores de IC₅₀ obtidos são mostrados na Tabela 20.

TABELA 20

Anticorpo	IC ₅₀ (nM)	SD
2B8	9,2	1,2
HE2B8-1	6,0	1,2
HE2B8-2	5,7	1,1
HE2B8-3	5,9	1,1
HE2B8-4	6,5	1,2
sh2B8-9 (G1m(3))	4,2	-
sh2B8-12 (G1m(3))	6,8	-

Estes resultados da Tabela 20 demonstram que os anticorpos humanizados testados neutralizaram eficazmente a ligação de HGF a c-Met.

- 5 Os anticorpos na Tabela 17 também foram testados no ensaio de proliferação celular descrito no Exemplo 7(b). Os resultados estão resumidos na Tabela 21.

TABELA 21

Anticorpo	IC ₅₀ (nM)	SD
2B8	0,86	0,35
HE2B8-1	0,47	0,15
HE2B8-2	0,66	0,13
HE2B8-3	0,55	0,28
HE2B8-4	0,58	0,26
sh2B8-9 (G1m(3))	0,52	0,11
sh2B8-12 (G1m(3))	0,81	0,22

- 10 Os resultados da Tabela 21 demonstram que todos os anticorpos humanizados testados inibiram a proliferação induzida por HGF em células 4MBr-5.

Exemplo 18 – Atividade Anti-Dispersão de Variantes Humanizadas de 2B8

Os anticorpos na Tabela 17 foram testados no ensaio anti-dispersão descrito no Exemplo 8. Os resultados estão resumidos abaixo na Tabela 22.

TABELA 22

Inibição de Dispersão de Célula MDCK induzida por HGF		
Anticorpo	Teste 1	Teste 2
2B8	++	++
HE2B8-1	++	++
HE2B8-2	++	++
HE2B8-3	++	++
HE2B8-4	++	++
sh2B8-9 (G1m(3))	++	++
sh2B8-12 (G1m(3))	++	++

- Nenhuma Inibição

+++ Inibição muito forte, quase completa inhibition

++ Inibição forte

+ Inibição detectável

5

Os resultados na Tabela 22 demonstram que todos os anticorpos humanizados testados inibiram a dispersão induzida por HGF na mesma extensão que o anticorpo monoclonal murino 2B8.

Exemplo 19 – Inibição de Fosforilação de c-Met estimulada por HGF

10

Os anticorpos na Tabela 17 foram testados no ensaio de fosforilação de c-Met descrito no Exemplo 9. Os resultados estão resumidos abaixo na Tabela 23.

TABELA 23

Anticorpo	Média de dois testes	Desvio Padrão
2B8	0,91	0,02
he2B8-1	0,80	0,04
he2B8-2	0,88	0,15
he2B8-3	0,79	0,05
he2B8-4	0,75	0,14
sh2B8-9 (G1m(3))	0,93	0,03
sh2B8-12 (G1m(3))	0,81	0,07

Os resultados na Tabela 23 demonstram que todos os anticor-

pos humanizados testados são potentes inibidores da fosforilação de c-Met induzida por HGF em células PC-3.

Exemplo 20 – Inibição tumoral em Modelo de Xenoenxerto de U87MG

5 A habilidade dos anticorpos monoclonais humanizados da invenção inibir o crescimento tumoral foi testada em um modelo de xenoenxerto de U87MG. Células U87MG (ATCC) foram expandidas em cultura a 37°C em uma atmosfera contendo 5% de CO₂ e 95% de ar, usando um meio que compreende meio de Eagle Modificado por Dulbecco (DMEM) com 10% de soro fetal bovino, 100 unidades/mL de penicilina e 100 µg/mL de estreptomomicina. As células foram subcultivadas e mantidas por desprender as células da parede da placa de cultura usando tripsina-EDTA.

Células quase confluentes foram coletadas por tripsinização e então 5 x 10⁶ células em Matrigel 50% (BD Biosciences; Nº de Catálogo 356237) foram injetadas subcutaneamente na área dorsal superior entre a escápula de camundongos ICR SCID fêmeas de 7 semanas de idade (Taconic Labs). Os diâmetros (mm) mais longos (L) e mais curtos (W) dos tumores foram medidos com um compasso de calibre. O volume tumoral (vol) foi calculado como: (mm³) = L x W² / 2. Quando os tumores cresceram para aproximadamente 200 mm³, os camundongos que possuíam os tumores foram randomizados em 5 grupos de 10 camundongos cada. Um grupo recebeu PBS e um grupo recebeu controle com IgG. Cada um dos outros 4 grupos recebeu um dos anticorpos humanizados (HE2B8-1, HE2B8-2, HE2B8-3, e HE2B8-4). Todos os anticorpos foram administrados em doses de 0,25 mg/kg de peso corporal, duas vezes por semana, por injeções intraperitoneais de 5 doses. Os volumes tumorais e os pesos corporais dos camundongos foram registrados duas vezes por semana. A inibição do crescimento tumoral foi analisada usando o teste de *t*-Student.

Os anticorpos humanizados testados eram ativos *in vivo*. Houve uma inibição do crescimento do tumor de 57% tumor para HE2B8-1 com um valor de p de 0,02, 61% de inibição do crescimento do tumor para HE2B8-2 com um valor de p de 0,02, 85% de inibição do crescimento do tumor para HE2B8-3, com um valor de p de 0,0004, e 74% de inibição do crescimento

do tumor para HE2B8-4 com um valor d p de 0,001. Nenhuma perda corporal significativa foi observada.

Um estudo subsequente foi realizado como descrito acima em camundongos nude NCR fêmeas com tumores de U87MG subcutâneos inoculados no flanco. Cada (10 camundongos cada) recebeu um dos seguintes tratamentos a 0,5 mg/kg: controle com veículo de PBS, controle de hulgG, HE2B8-4, ou sh2B8-9. O tratamento foi dado intra-peritonealmente duas vezes por semana por um mínimo de 5 semanas. Cada grupo de tratamento demonstrou regressão tumoral similar com inibição do crescimento do tumor de 113% para sh2B8-9 e 115% para HE2B8-4, e um retardo mínimo do crescimento do tumor de 30 dias. Ambos os tratamentos foram bem tolerados sem perdas corporais significativas.

Incorporação por Referência

A descrição completa de cada um dos documentos de patente e artigos científicos referidos aqui está incorporada por referência para todos os propósitos.

Equivalentes

A invenção ser concretizada em outras formas específicas sem se afastar do espírito ou características essenciais desta. As modalidades anteriores são, portanto para serem consideradas, em todos os aspectos, como ilustrativas ao invés de limitantes da invenção aqui descrita. O escopo da invenção é indicado assim pelas reivindicações anexas e não pela descrição anterior, e todas as alterações que se encontram dentro do significado e amplitude de equivalência das reivindicações são pretendidas para serem abrangidas nela.

Listagem de Seqüência

<110> Han, May
 Wright, Kirk S.
 Winston, William M.

5 Breault, Lyne
 Lin, Jie
 Etemad-Gilbertson, Bijan
 Knuehl, Christine
 Gyuris, Jeno

10 <120> Hepatocyte Growth Factor (HGF) Binding Proteins
 <130> AVO-001A
 <150> 60/810,714
 <151> 2006-06-02
 <150> 60/860,461

15 <151> 2006-11-21
 <160> 216
 <170> PatentIn version 3.3
 <210> 1
 <211> 424

20 <212> DNA
 <213> Seqüência Artificial
 <220>
 <223> Synthetic Heavy Chain Variable Region 1A3
 <400> 1

25 atgaactttg ggctcagatt gattttcctt gtccttgttt taaaagggtg gaagtgtgaa 60
 gtgcagctgg tggagtctgg gggaggctta gtgcagcctg gagggtcctt gaaactctcc 120
 tgtgcagcct ctgaattcac tttcagtaac tattacatgt cttgggttcg ccagactcca 180
 gagaagaggc tgcagtgggt cgcatacatt agtcctgggtg gtggtagctc ctactatcca 240
 gccagtgtga agggctgatt caccatctcc agagacaatg ccaagaacac cctgtacctg 300

30 caaatgagca gtctgaagtc tgaggacaca gccatgtatt actgtgcaag acaaggggat 360
 ggttactacg gggactatgc tatggactac tgggggtcaag gaacctcagt caccgtctcc 420
 tcag 424

<210> 2
 <211> 141
 <212> PRT
 <213> Sequência Artificial
 5 <220>
 <223> synthetic Heavy Chain Variable Region 1A3
 <400> 2
 Met Asn Phe Gly Leu Arg Leu Ile Phe Leu Val Leu Val Leu Lys Gly
 1 5 10 15
 10 Val Lys Cys Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln
 20 25 30
 Pro Gly Gly Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Glu Phe Thr Phe
 35 40 45
 Ser Asn Tyr Tyr Met Ser Trp Val Arg Gln Thr Pro Glu Lys Arg Leu
 15 50 55 60
 Gln Trp Val Ala Tyr Ile Ser Pro Gly Gly Gly Ser Ser Tyr Tyr Pro
 65 70 75 80
 Ala Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn
 85 90 95
 20 Thr Leu Tyr Leu Gln Met Ser Ser Leu Lys Ser Glu Asp Thr Ala Met
 100 105 110
 Tyr Tyr Cys Ala Arg Gln Gly Asp Gly Tyr Tyr Gly Asp Tyr Ala Met
 115 120 125
 Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr ser val Thr val ser ser
 25 130 135 140
 <210> 3
 <211> 382
 <212> DNA
 <213> Sequência Artificial
 30 <220>
 <223> Synthetic Light (kappa) chain Variable Region 1A3
 <400> 3

atgagtgtgc cactcaggt cctggggttg ctgctgctgt ggcttacaga tgccagatgt 60
 gacatccaga tgactcagtc tccagcctcc ctatctgttt ctgtgggaga aactgtcacc 120
 atcacatgtc gagcaagtga gaatatttat agtaatttag catggtatca gcagaaacag 180
 ggaaaatctc ctgagctcct ggtctatgct gcaacaaact tagcagatgg tgtgccatca 240
 5 aggttcagtg gcagtggatc aggcacacag ttttcctca agatcaacag cctgcagtct 300
 gaagattttg ggacttatta ctgtcaacat ttttggggta ctccgtacac gttcggaggg 360
 gggaccaagc tggaaataaa ac 382
 <210> 4
 <211> 127
 10 <212> PRT
 <213> Sequência Artificial
 <220>
 <223> Synthetic Light (kappa) chain Variable Region 1A3
 <400> 4
 15 Met Ser Val Pro Thr Gln Val Leu Gly Leu Leu Leu Leu Trp Leu Thr
 1 5 10 15
 Asp Ala Arg Cys Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ser
 20 25 30
 Val Ser Val Gly Glu Thr Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Glu Asn
 20 35 40 45
 Ile Tyr Ser Asn Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Gln Gly Lys Ser Pro
 50 55 60
 Gln Leu Leu Val Tyr Ala Ala Thr Asn Leu Ala Asp Gly Val Pro Ser
 65 70 75 80
 25 Arg Phe Ser Gly Ser Gly ser Gly Thr Gln Phe Ser Leu Lys Ile Asn
 85 90 95
 Ser Leu Gln Ser Glu Asp Phe Gly Thr Tyr Tyr Cys Gln His Phe Trp
 100 105 110
 Gly Thr Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 30 115 120 125
 <210> 5
 <211> 5

<212> PRT
 <213> Sequência Artificial
 <220>
 <223> Synthetic Heavy Chain CDR1 1A3
 5 <400> 5
 Asn Tyr Tyr Met Ser
 1 5
 <210> 6
 <211> 17
 10 <212> PRT
 <213> Sequência Artificial
 <220>
 <223> Synthetic Heavy Chain CDR2 1A3
 <400> 6
 15 Tyr Ile Ser Pro Gly Gly Gly Ser Ser Tyr Tyr Pro Ala Ser Val Lys
 1 5 10 15
 Gly
 <210> 7
 <211> 13
 20 <212> PRT
 <213> Sequência Artificial
 <220>
 <223> Synthetic Heavy Chain CDR3 1A3
 <400> 7
 25 Gln Gly Asp Gly Tyr Tyr Gly Asp Tyr Ala Met Asp Tyr
 1 5 10
 <210> 8
 <211> 11
 <212> PRT
 30 <213> Sequência Artificial
 <220>
 <223> Synthetic Light (kappa) Chain CDR1 1A3

<400> 8
 Arg Ala Ser Glu Asn Ile Tyr Ser Asn Leu Ala
 1 5 10
 <210> 9
 5 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Sequência Artificial
 <220>
 <223> Synthetic Light (kappa) Chain CDR2 1A3
 10 <400> 9
 Ala Ala Thr Asn Leu Ala Asp
 1 5
 <210> 10
 <211> 9
 15 <212> PRT
 <213> Sequência Artificial
 <220>
 <223> Synthetic Light (kappa) Chain CDR3 1A3
 <400> 10
 20 Gln His Phe Trp Gly Thr Pro Tyr Thr
 1 5
 <210> 11
 <211> 412
 <212> DNA
 25 <213> Sequência Artificial
 <220>
 <223> Synthetic Heavy Chain Variable Region 2B8
 <400> 11
 atgggatgga gctatatcat cctctttttg gtagcaacag ctacagatgt ccactcccag 60
 30 gtccaactgc agcagcctgg ggctgaactg gtgaagcctg ggacttcagt gaagctgtcc 120
 tgcaaggctt ctggctacac cttcaccacc tactggatgc actgggtgaa tcagaggcct 180
 ggacaaggcc ttgagtggat tggagagatt aatcctacca acggtcatac taactacaat 240

gagaagttca agagcaaggc cacactgact gtagacaaat cctccagcac agcctacatg 300
 caactcagca gcctgacatc tgaggactct gcggtctatt actgtgcaag aaactatggt 360
 ggtagcatct ttgactactg gggccaaggc accactctca cagtctcctc ag 412
 <210> 12
 5 <211> 137
 <212> PRT
 <213> Sequência Artificial
 <220>
 <223> Synthetic Heavy Chain Variable Region 2B8
 10 <400> 12
 Met Gly Trp Ser Tyr Ile Ile Leu Phe Leu Val Ala Thr Ala Thr Asp
 1 5 10 15
 Val His Ser Gln Val Gln Leu Gln Gln Pro Gly Ala Glu Leu Val Lys
 20 25 30
 15 Pro Gly Thr Ser Val Lys Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe
 35 40 45
 Thr Thr Tyr Trp Met His Trp Val Asn Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu
 50 55 60
 Glu Trp Ile Gly Glu Ile Asn Pro Thr Asn Gly His Thr Asn Tyr Asn
 20 65 70 75 80
 Glu Lys Phe Lys Ser Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser
 85 90 95
 Thr Ala Tyr Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val
 100 105 110
 25 Tyr Tyr Cys Ala Arg Asn Tyr Val Gly Ser Ile Phe Asp Tyr Trp Gly
 115 120 125
 Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser
 130 135
 <210> 13
 30 <211> 382
 <212> DNA
 <213> Sequência Artificial

<220>
 <223> Synthetic Light (kappa) Chain Variable Region 2B8
 <400> 13

atggaatcac agactctggt cttcatatcc atactgctct gggttatatgg tgctgatggg 60
 5 aacattgtaa tgaccaatc tcccaaatcc atgtccatgt cagtaggaga gagggtcacc 120
 ttgagctgca aggccagtga gaatgtgggt tcttatgtat cctgggatca acagaaacca 180
 gcgcagtctc ctaaactgct gatatacggg gcatccaacc ggaacactgg ggtccccgat 240
 cgcttcacag gcagtggatc tgcaacagat ttcactctga ccatcagcag tgtgcgggct 300
 gaagaccttg cagattatca ctgtgggcag agttacaact atccgtacac gttcggaggg 360
 10 gggaccaggc tggaaataaa ac 382

<210> 14
 <211> 127
 <212> PRT
 <213> Sequência Artificial

15 <220>
 <223> Synthetic Light (kappa) Chain Variable Region 2B8
 <400> 14

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

	115	120	125
	<210> 15		
	<211> 5		
	<212> PRT		
5	<213> Sequência Artificial		
	<220>		
	<223> Synthetic Heavy Chain CDR1 2B8		
	<400> 15		
	Thr Tyr Trp Met His		
10	1	5	
	<210> 16		
	<211> 17		
	<212> PRT		
	<213> Sequência Artificial		
15	<220>		
	<223> Synthetic Heavy Chain CDR2 2B8		
	<400> 16		
	Glu Ile Asn Pro Thr Asn Gly His Thr Asn Tyr Asn Glu Lys Phe Lys		
	1	5	10 15
20	Ser		
	<210> 17		
	<211> 9		
	<212> PRT		
	<213> Sequência Artificial		
25	<220>		
	<223> Synthetic Heavy Chain CDR3 2B8		
	<400> 17		
	Asn Tyr Val Gly Ser Ile Phe Asp Tyr		
	1	5	
30	<210> 18		
	<211> 11		
	<212> PRT		

gtccagctga agcagctctgg agctgagctg gtgaggcctg ggacttcagt gaagatgtcc 120
 tgcaaggctt ctggctacac cttcactacc tactatatac actgggtgaa tcagaggcct 180
 ggacagggcc ttgagtggat tggaaagatt ggtcctggaa gtggtagtac ttactacaat 240
 gagatgttca aagacaaggc cacattgact gtagacacat cctccagcac agcctacatg 300
 5 cagctcagca gcctgacatc tgacgactct gcggtctatt tctgtgcaag aaggggactg 360
 ggacgtggct ttgactactg gggccaaggc accactctca cagtctcctc ag 412
 <210> 22
 <211> 137
 <212> PRT
 10 <213> Sequência Artificial
 <220>
 <223> Synthetic Heavy Chain Variable Region 2F8
 <400> 22
 Met Glu Trp Ser Trp Val Phe Leu Phe Leu Leu Ser Val Thr Ala Gly
 15 1 5 10 15
 Val His Cys Gln Val Gln Leu Lys Gln Ser Gly Ala Glu Leu Val Arg
 20 25 30
 Pro Gly Thr Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe
 35 40 45
 20 Thr Thr Tyr Tyr Ile His Trp Val Asn Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu
 50 55 60
 Glu Trp Ile Gly Lys Ile Gly Pro Gly Ser Gly Ser Thr Tyr Tyr Asn
 65 70 75 80
 Glu Met Phe Lys Asp Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Thr Ser Ser Ser
 25 85 90 95
 Thr Ala Tyr Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Asp Asp Ser Ala Val
 100 105 110
 Tyr Phe Cys Ala Arg Arg Gly Leu Gly Arg Gly Phe Asp Tyr Trp Gly
 115 120 125
 30 Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser
 130 135
 <210> 23

<211> 394
 <212> DNA
 <213> Seqüência Artificial
 <220>
 5 <223> Synthetic Light (kappa) Chain Variable Region 2F8
 <400> 23
 atggagacag acacaatcct gctatgggtg ctgctgctct gggttccagg ctccactggt 60
 gacattgtgc tgaccaatc tccagcttct ttggctgtgt ctctagggca gagggccacc 120
 atctcctgca aggccagcca aagtgttgat tatgatggta atagttatat caactggtag 180
 10 caacagaaac caggacagcc acccaaagtc ctcatctatg ttgcatccaa tctagaatct 240
 gggatcccag ccaggtttag tggcagtggg tctgggacag acttcacct caacatccat 300
 cctgtggagg aggaggatgc tgcaacctat tactgtcagc aaagtattga ggatcctccc 360
 acgttcggtg ctgggaccaa gctggagctg aaac 394
 <210> 24
 15 <211> 131
 <212> PRT
 <213> Seqüência Artificial
 <220>
 <223> Synthetic Light (kappa) Chain Variable Region 2F8
 20 <400> 24
 Met Glu Thr Asp Thr Ile Leu Leu Trp Val Leu Leu Leu Trp Val Pro
 1 5 10 15
 Gly Ser Thr Gly Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ala
 20 25 30
 25 Val Ser Leu Gly Gln Arg Ala Thr Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gln Ser
 35 40 45
 Val Asp Tyr Asp Gly Asn Ser Tyr Ile Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro
 50 55 60
 Gly Gln Pro Pro Lys Val Leu Ile Tyr Val Ala Ser Asn Leu Glu Ser
 30 65 70 75 80
 Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr
 85 90 95

<213> Sequência Artificial
 <220>
 <223> Synthetic Heavy Chain Variable Region 3B6
 <400> 31

5 atggaatggc cttgtatctt tctcttcctc ctgtcagtaa ctgaaggtgt ccaactcccag 60
 gttcagctgc agcagtctgg ggctgaactg gtgaggcctg ggtcctcagt gaagatttcc 120
 tgcaaggctt ctggctatgt attcagtagc tactggatga actgggtgaa gcagaggcct 180
 ggacagggtc ttgagtggat tggacagatt tatcctggag atggtgatag taactacaat 240
 ggaaacttca agggtaaagc cacactgact gcagacaaat cctccagtac agcctacatg 300
 10 cagctcagca gcctaacatc tgaggactct gcggtctatt tctgtgcatc ccagctcggg 360
 ctacgtgaga actactttga ctactggggc caaggcacca ctctcacagt ctcctcag 418

<210> 32
 <211> 139
 <212> PRT

15 <213> Sequência Artificial
 <220>
 <223> Synthetic Heavy Chain Variable Region 3B6
 <400> 32

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

Tyr Phe Cys Ala Ser Gln Leu Gly Leu Arg Glu Asn Tyr Phe Asp Tyr
 115 120 125
 Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser
 130 135

5 <210> 33
 <211> 388
 <212> DNA
 <213> Sequência Artificial
 <220>

10 <223> Synthetic Light (kappa) Chain Variable Region 3B6
 (2 possible ATG start codons)
 <400> 33

atggacatga ggaccctgc tcagtttctt ggaatcttgt tgctctggtt tccaggtatc 60
 aaatgtgaca tcaagatgac ccagctctcca tcttccatgt atgcatctct aggagagaga 120
 15 gtcacaatca cttgcaaggc gagtcaggac attaaaagct atttaagctg gttccagcag 180
 aaaccagga aatctcctaa gaccctgac tatcgtgtaa acagattggt agatggggtc 240
 ccatcaaggt tcagtggcag tggatctggg caagattctt ctctcaccat caccagcctg 300
 gagaatgaag atatgggaat ttattattgt ctacagtatg atgagtttcc gttcacgttc 360
 ggagggggga ccaagctgga aataaagc 388

20 <210> 34
 <211> 129
 <212> PRT
 <213> Sequência Artificial
 <220>

25 <223> Synthetic Light (kappa) Chain Variable Region 3B6
 (2 possible start Methionines)
 <400> 34

Met Asp Met Arg Thr Pro Ala Gln Phe Leu Gly Ile Leu Leu Leu Trp
 1 5 10 15

30 Phe Pro Gly Ile Lys Cys Asp Ile Lys Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser
 20 25 30

Met Tyr Ala Ser Leu Gly Glu Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser

<211> 11
 <212> PRT
 <213> Seqüência Artificial
 <220>
 5 <223> Synthetic Heavy Chain CDR3 3B6
 <400> 37
 Gln Leu Gly Leu Arg Glu Asn Tyr Phe Asp Tyr
 1 5 10
 <210> 38
 10 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Seqüência Artificial
 <220>
 <223> Synthetic Light (kappa) Chain CDR1 3B6
 15 <400> 38
 Lys Ala Ser Gln Asp Ile Lys Ser Tyr Leu Ser
 1 5 10
 <210> 39
 <211> 7
 20 <212> PRT
 <213> Seqüência Artificial
 <220>
 <223> Synthetic Light (kappa) Chain CDR2 3B6
 <400> 39
 25 Arg Val Asn Arg Leu Val Asp
 1 5
 <210> 40
 <211> 9
 <212> PRT
 30 <213> Seqüência Artificial
 <220>
 <223> Synthetic Light (kappa) Chain CDR3 3B6

<400> 40
 Leu Gln Tyr Asp Glu Phe Pro Phe Thr
 1 5
 <210> 41
 5 <211> 397
 <212> DNA
 <213> Sequência Artificial
 <220>
 <223> Synthetic Heavy Chain Variable Region 3D11
 10 <400> 41
 atggctgtcc cggtgctggt cctctgcctg gttgcatttc caagctgtgt cctgtcccag 60
 gtacagctga aggagtcagg acctggcctg gtggcgccct cacagagcct gtccatcact 120
 tgcactgtct ctgggttttc attaaccagc tatagtttac actgggttcg ccagcctcca 180
 ggaaagggtc tggaatggct gggagtaata tgggctggtg gaaacacaaa ttataattcg 240
 15 tctctcatgt ccagactgac catcaggaaa gacaactcca agagccaagt tttcttaaaa 300
 atgaacagtc tgcaaactga tgacacagcc atgtactact gtgccagaga gaggtttgct 360
 tactggggcc aagggactct ggtcactgtc tctgcag 397
 <210> 42
 <211> 132
 20 <212> PRT
 <213> Sequência Artificial
 <220>
 <223> Synthetic Heavy Chain Variable Region 3D11
 <400> 42
 25 Met Ala Val Pro Val Leu Phe Leu Cys Leu Val Ala Phe Pro Ser Cys
 1 5 10 15
 Val Leu Ser Gln Val Gln Leu Lys Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Ala
 20 25 30
 Pro Ser Gln Ser Leu Ser Ile Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu
 30 35 40 45
 Thr Ser Tyr Ser Leu His Trp Val Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu
 50 55 60

1 5 10 15
 Val Lys Ile Ser Arg Gly Gln Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ile
 20 25 30
 Met Ser Ala Tyr Pro Gly Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Ser Ala Ser
 5 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
 10 Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile
 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 Leu Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys
 15 115 120 125
 <210> 45
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Seqüência Artificial
 20 <220>
 <223> Synthetic Heavy Chain CDR1 3D11
 <400> 45
 Ser Tyr Ser Leu His
 1 5
 25 <210> 46
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Seqüência Artificial
 <220>
 30 <223> Synthetic Heavy Chain CDR2 3D11
 <400> 46
 Val Ile Trp Ala Gly Gly Asn Thr Asn Tyr Asn Ser Ser Leu Met Ser

	1	5	10	15
	<210> 47			
	<211> 5			
	<212> PRT			
5	<213> Sequência Artificial			
	<220>			
	<223> Synthetic Heavy Chain CDR3 3D11			
	<400> 47			
	Glu Arg Phe Ala Tyr			
10	1	5		
	<210> 48			
	<211> 10			
	<212> PRT			
	<213> Sequência Artificial			
15	<220>			
	<223> Synthetic Light (kappa) Chain CDR1 3D11			
	<400> 48			
	Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met His			
	1	5	10	
20	<210> 49			
	<211> 7			
	<212> PRT			
	<213> Sequência Artificial			
	<220>			
25	<223> Synthetic Light (kappa) Chain CDR2 3D11			
	<400> 49			
	Asp Thr Ser Lys Leu Ala Ser			
	1	5		
	<210> 50			
30	<211> 9			
	<212> PRT			
	<213> Sequência Artificial			

<220>
 <223> Synthetic Light (kappa) Chain CDR3 3D11
 <400> 50
 Gln Gln Trp Ser Ser Asn Pro Leu Thr
 5 1 5
 <210> 51
 <211> 424
 <212> DNA
 <213> Sequência Artificial
 10 <220>
 <223> Synthetic Heavy Chain Variable Region 1D3
 <400> 51
 atgaactttg ggctcagatt gattttcctt gtccttgttt taaaagggtg gaagtgtgaa 60
 gtgcagctgg tggagtctgg gggaggctta gtgcagcctg gagggtccct gaaactctcc 120
 15 tgtgcagcct ctggattcac tttcagtgac tattacatgt cttgggttcg ccagactcca 180
 gagaagaggc tggagtgggt cgcatacatt agtagtggtg gtggtagcac ctactatcca 240
 gacagtgtga agggtcgatt caccatctcc cgagacaatg ccaagaacac cctgtacctg 300
 caaatgagca gtctgaagtc tgaggacaca gccatatatt actgtgtgag acaaggggat 360
 ggttattacg gggactatgc tatggactac tggggccaag gaacctcagt catcgtctcc 420
 20 tcag 424
 <210> 52
 <211> 141
 <212> PRT
 <213> Sequência Artificial
 25 <220>
 <223> Synthetic Heavy Chain Variable Region 1D3
 <400> 52
 Met Asn Phe Gly Leu Arg Leu Ile Phe Leu Val Leu Val Leu Lys Gly
 1 5 10 15
 30 Val Lys Cys Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln
 20 25 30
 Pro Gly Gly Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe

	35		40		45	
	Ser Asp Tyr Tyr Met Ser Trp Val Arg Gln Thr Pro Glu Lys Arg Leu					
	50		55		60	
	Glu Trp Val Ala Tyr Ile Ser Ser Gly Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Pro					
5	65		70		75	80
	Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn					
		85		90		95
	Thr Leu Tyr Leu Gln Met Ser Ser Leu Lys Ser Glu Asp Thr Ala Ile					
		100		105		110
10	Tyr Tyr Cys Val Arg Gln Gly Asp Gly Tyr Tyr Gly Asp Tyr Ala Met					
		115		120		125
	Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Ile Val Ser Ser					
		130		135		140
	<210>	53				
15	<211>	382				
	<212>	DNA				
	<213>	Seqüência Artificial				
	<220>					
	<223>	Synthetic Light (kappa) Chain Variable Region 1D3				
20	<400>	53				
	atgagtgtgc ccactcaggt cctgggggttg ctgctgctgt ggcttacaga tgcagatgt				60	
	gacatccaga tgactcagtc tccagcctcc ctatctgtat ctgtgggaga aactgtcacc				120	
	atcacatgtc gaacaagtga gaatatttac agtaatttag cgtgggtatca gcagaaacag				180	
	ggaaaatctc ctgagctcct aatctatgct gcaacaaact tagcagatgg tgtgcatca				240	
25	aggttcagtg gcagtggatc aggcacacag ttttcctca ggatcaacag cctgcagtct				300	
	gaagattttg ggaggtatta ctgtcaacat ttttggggga ctccgtacac gttcggaggg				360	
	gggaccaaac tggaaataaa ac				382	
	<210>	54				
	<211>	127				
30	<212>	PRT				
	<213>	Seqüência Artificial				
	<220>					

<223> Synthetic Light (kappa) Chain Variable Region 1D3
 <400> 54
 Met Ser Val Pro Thr Gln Val Leu Gly Leu Leu Leu Leu Trp Leu Thr
 1 5 10 15
 5 Asp Val Arg Cys Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ser
 20 25 30
 Val Ser Val Gly Glu Thr Val Thr Ile Thr Cys Arg Thr Ser Glu Asn
 35 40 45
 Ile Tyr Ser Asn Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Gln Gly Lys Ser Pro
 10 50 55 60
 Gln Leu Leu Ile Tyr Ala Ala Thr Asn Leu Ala Asp Gly Val Pro Ser
 65 70 75 80
 Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Gln Phe Ser Leu Arg Ile Asn
 85 90 95
 15 Ser Leu Gln Ser Glu Asp Phe Gly Arg Tyr Tyr Cys Gln His Phe Trp
 100 105 110
 Gly Thr Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 115 120 125
 <210> 55
 20 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Sequência Artificial
 <220>
 <223> Synthetic Heavy Chain CDR1 1D3
 25 <400> 55
 Asp Tyr Tyr Met Ser
 1 5
 <210> 56
 <211> 17
 30 <212> PRT
 <213> Sequência Artificial
 <220>

<223> Synthetic Heavy Chain CDR2 1D3

<400> 56

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

1 5 10 15

5 Gly

<210> 57

<211> 13

<212> PRT

10 <213> Seqüência Artificial

<220>

<223> Synthetic Heavy Chain CDR3 1D3

<400> 57

Gln Gly Asp Gly Tyr Tyr Gly Asp Tyr Ala Met Asp Tyr

15 1 5 10

<210> 58

<211> 11

<212> PRT

<213> Seqüência Artificial

20 <220>

<223> Synthetic Light (kappa) Chain CDR1 1D3

<400> 58

Arg Thr Ser Glu Asn Ile Tyr Ser Asn Leu Ala

1 5 10

25 <210> 59

<211> 7

<212> PRT

<213> Seqüência Artificial

<220>

30 <223> Synthetic Light (kappa) Chain CDR2 1D3

<400> 59

Ala Ala Thr Asn Leu Ala Asp

1 5
 <210> 60
 <211> 9
 <212> PRT
 5 <213> Seqüência Artificial
 <220>
 <223> Synthetic Light (kappa) Chain CDR3 1D3
 <400> 60
 Gln His Phe Trp Gly Thr Pro Tyr Thr
 10 1 5
 <210> 61
 <211> 424
 <212> DNA
 <213> Seqüência Artificial
 15 <220>
 <223> Synthetic Heavy Chain Variable Region 1F3
 <400> 61
 atgaactttg ggctcagatt gattttcctt gtccttgttt taaaagggtg gaagtgtgag 60
 gtgcagctgg tggagtctgg gggaggctta gtgcagtctg gagggtccct gaaactctcc 120
 20 tgtgcccct ctggattcac tttcagtaac ttttcatgt cttgggttcg ccagactcca 180
 gagaagaggc tggagtgggt cgcatatatt agtagtggtg gtggtagcac ctactatcca 240
 gacagtgtga agggtcgatt caccatctct agagacaatg ccaagaacac cctgtacctg 300
 caaatgagca gtctgaagtc tgaggacaca gccatgtatt actgtgtaag acaaggggat 360
 ggttactacg gggactatgc tatggactac tggggtcaag gaacctcagt caccgtctcc 420
 25 tcag 424
 <210> 62
 <211> 141
 <212> PRT
 <213> Seqüência Artificial
 30 <220>
 <223> Synthetic Heavy Chain Variable Region 1F3
 <400> 62

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

- <210> 63
- 20 <211> 382
- <212> DNA
- <213> Sequência Artificial
- <220>
- <223> Synthetic Light (kappa) Chain Variable Region 1F3

25 <400> 63
 atgagtgtgc ccactcaggt cctgggggttg ctgctgctgt ggcttacaga tgccagatgt 60
 gacatccaga tgactcagtc tccagcctcc ctatctgtat ctgtgggaga aactgtcacc 120
 atcacatgtc gagcaagtga gaatatttac agtaatttag catggtatca gcagaaacag 180
 ggaaaatctc ctcagctcct ggtctatgat gcaacacact taccagatgg tgtgccatca 240
 30 aggttcagtg gcagtggatc aggcacacag tttccctca agatcaacag cctgcagtct 300
 gaagattttg ggagttatta ctgtcaacat ttttggggta ctccgtacac gtttgaggagg 360
 gggaccagac tggaaattaa ac 382

<210> 64
 <211> 127
 <212> PRT
 <213> Sequência Artificial
 5 <220>
 <223> Synthetic Light (kappa) Chain Variable Region 1F3
 <400> 64
 Met Ser Val Pro Thr Gln Val Leu Gly Leu Leu Leu Trp Leu Thr
 1 5 10 15
 10 Asp Ala Arg Cys Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ser
 20 25 30
 Val Ser Val Gly Glu Thr Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Glu Asn
 35 40 45
 Ile Tyr Ser Asn Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Gln Gly Lys Ser Pro
 15 50 55 60
 Gln Leu Leu Val Tyr Asp Ala Thr His Leu Pro Asp Gly Val Pro Ser
 65 70 75 80
 Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Gln Phe Ser Leu Lys Ile Asn
 85 90 95
 20 Ser Leu Gln Ser Glu Asp Phe Gly Ser Tyr Tyr Cys Gln His Phe Trp
 100 105 110
 Gly Thr Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Arg Leu Glu Ile Lys
 115 120 125
 <210> 65
 25 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Sequência Artificial
 <220>
 <223> Synthetic Heavy Chain CDR1 1F3
 30 <400> 65
 Asn Tyr Phe Met Ser
 1 5

<210> 66
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Sequência Artificial
 5 <220>
 <223> Synthetic Heavy Chain CDR2 1F3
 <400> 66
 Tyr Ile Ser Ser Gly Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Pro Asp Ser Val Lys
 1 5 10 15
 10 Gly
 <210> 67
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Sequência Artificial
 15 <220>
 <223> Synthetic Heavy Chain CDR3 1F3
 <400> 67
 Gln Gly Asp Gly Tyr Tyr Gly Asp Tyr Ala Met Asp Tyr
 1 5 10
 20 <210> 68
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Sequência Artificial
 <220>
 25 <223> Synthetic Light (kappa) Chain CDR1 1F3
 <400> 68
 Arg Ala Ser Glu Asn Ile Tyr Ser Asn Leu Ala
 1 5 10
 <210> 69
 30 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Sequência Artificial

<220>
 <223> Synthetic Light (kappa) Chain CDR2 1F3
 <400> 69
 Asp Ala Thr His Leu Pro Asp
 5 1 5
 <210> 70
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Seqüência Artificial
 10 <220>
 <223> Synthetic Light (kappa) Chain CDR3 1F3
 <400> 70
 Gln His Phe Trp Gly Thr Pro Tyr Thr
 1 5
 15 <210> 71
 <211> 424
 <212> DNA
 <213> Seqüência Artificial
 <220>
 20 <223> Synthetic Heavy Chain variable Region 3A12
 <400> 71
 atgaactttg ggctcagatt gattttcctt gtccttgttt taaaagggtg gaagtgtgaa 60
 gtgcagctgg tggagtctgg gggaggctta gtgcagcctg gagggtccct gaaaatctcc 120
 tgtgcagcct ctggatttac tttcagtaac tatttcatgt cttgggttcg ccagactcca 180
 25 gagaagaggc tggagtgggt cgcatacatt agtagtggtg gtggtagcac ctactatcca 240
 gacagtgtga agggctgatt caccatctcc agagacaatg ccaagaacac cctgtacctg 300
 caaatgaaca gtctgaagtc tgaggacaca gccatgtatt actgtgtaag acaaggagat 360
 ggttactatg gggactatgc tatggactac tggggtaag gaacctcagt caccgtctcc 420
 tcag 424
 30 <210> 72
 <211> 141
 <212> PRT

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> Synthetic Heavy Chain Variable Region 3A12

<400> 72

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

<210> 73

<211> 382

25 <212> DNA

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> Synthetic Light (kappa) Chain Variable Region 3A12

<400> 73

30 atgagtgtgc cactcaggt cctggggttg ctgctgctgt ggcttacaga tgccagatgt 60
 gacatccaga tgactcagtc gccagcctcc ctatctgtat ctgtgggaga aactgtcacc 120
 atcacatgtc gagcaagtga gaattttac attaatntag catggtatca gcagaaacag 180

```

ggaaaatctc ctcagctcct ggtccatgct gcaacaaagt tagcagatgg tgtgcatca 240
aggttcagtg gcagtggatc aggcacacag tattccctca agatcaacag cctgcagtct 300
gaagatTTTTG ggagttatta ctgtcaacat ttttggggta ctccgtacac gttcggaggg 360
gggaccaaac tagaaataaa ac 382
5 <210> 74
  <211> 127
  <212> PRT
  <213> Seqüência Artificial
  <220>
10 <223> synthetic Light (kappa) Chain Variable Region 3A12
  <400> 74
Met Ser Val Pro Thr Gln Val Leu Gly Leu Leu Leu Leu Trp Leu Thr
1           5           10           15
Asp Ala Arg Cys Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ser
15           20           25           30
Val Ser Val Gly Glu Thr Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Glu Asn
           35           40           45
Ile Tyr Ile Asn Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Gln Gly Lys Ser Pro
           50           55           60
20 Gln Leu Leu Val His Ala Ala Thr Lys Leu Ala Asp Gly Val Pro Ser
65           70           75           80
Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Gln Tyr Ser Leu Lys Ile Asn
           85           90           95
Ser Leu Gln Ser Glu Asp Phe Gly Ser Tyr Tyr Cys Gln His Phe Trp
25           100          105          110
Gly Thr Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
           115          120          125
<210> 75
<211> 5
30 <212> PRT
  <213> Seqüência Artificial
  <220>

```


<210> 79
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Sequência Artificial
 5 <220>
 <223> Synthetic Light (kappa) Chain CDR2 3A12
 <400> 79
 Ala Ala Thr Lys Leu Ala Asp
 1 5
 10 <210> 80
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Sequência Artificial
 <220>
 15 <223> Synthetic Light (kappa) Chain CDR3 3A12
 <400> 80
 Gln His Phe Trp Gly Thr Pro Tyr Thr
 1 5
 <210> 81
 20 <211> 974
 <212> DNA
 <213> Sequência Artificial
 <220>
 <223> Reference Mouse IgG1 Heavy Chain Constant Region (J00453)
 25 <400> 81
 ccaaaacgac acccccatct gtctatccac tggcccctgg atctgctgcc caaactaact 60
 ccatgggtgac cctgggatgc ctggtcaagg gctatttccc tgagccagtg acagtgacct 120
 ggaactctgg atccctgtcc agcgggtgac acaccttccc agctgtcctg gagtctgacc 180
 tctacactct gagcagctca gtgactgtcc cctccagccc tcggcccagc gagaccgtca 240
 30 cctgcaacgt tgcccacccg gccagcagca ccaaggtgga caagaaaatt gtgcccaggg 300
 attgtggttg taagccttgc atatgtacag tcccagaagt atcatctgtc ttcattctcc 360
 ccccaaagcc caaggatgtg ctcaccatta ctctgactcc taaggtcacg tgtgttgtgg 420

	tagacatcag caaggatgat cccgaggtcc agttcagctg gttttagat gatgtggagg	480
	tgcacacagc tcagacgcaa ccccgggagg agcagttcaa cagcactttc cgctcagtca	540
	gtgaacttcc catcatgcac caggactggc tcaatggcaa ggagttcaaa tgcaggggtca	600
	acagtgacgc tttccctgcc cccatcgaga aaaccatctc caaaaccaa ggcagaccga	660
5	aggctccaca ggtgtacacc attccacctc ccaaggagca gatggccaag gataaagtca	720
	gtctgacctg catgataaca gacttcttcc ctgaagacat tactgtggag tggcagtgga	780
	atgggcagcc agcggagaac tacaagaaca ctcagcccat catgaacacg aatggctctt	840
	acttcgtcta cagcaagctc aatgtgcaga agagcaactg ggaggcagga aatactttca	900
	cctgctctgt gttacatgag ggctgcaca accaccatac tgagaagagc ctctcccact	960
10	ctcctggtaa atga	974
	<210> 82	
	<211> 974	
	<212> DNA	
	<213> Sequência Artificial	
15	<220>	
	<223> Mouse IgG1 Heavy Chain Constant Region Determined for	
	1A3, 1D3, 1F3, and 2B8 (derived from AJ strain mice)	
	<400> 82	
	ccaaaacgac acccccatct gtctatccac tggcccctgg atctgctgcc caaactaact	60
20	ccatgggtgac cctgggatgc ctggtcaagg gctatcttcc tgagccagtg acagtgacct	120
	ggaactctgg atccctgtcc agcgggtgtgc acaccttccc agctgtcctg cagtctgacc	180
	tctacactct gaggcagctca gtgactgtcc cctccagcac ctggcccagc gagaccgtca	240
	cctgcaacgt tgcccacccg gccagcagca ccaaggtgga caagaaaatt gtgcccaggg	300
	attgtggttg taagccttgc atatgtacag tcccagaagt atcatctgtc ttcattctcc	360
25	cccaaagcc caaggatgtg ctaccatta ctctgactcc taaggtcacg tgtgttgg	420
	tagacatcag caaggatgat cccgaggtcc agttcagctg gttttagat gatgtggagg	480
	tgcacacagc tcagacgcaa ccccgggagg agcagttcaa cagcactttc cgctcagtca	540
	gtgaacttcc catcatgcac caggactggc tcaatggcaa ggagttcaaa tgcaggggtca	600
	acagtgacgc tttccctgcc cccatcgaga aaaccatctc caaaaccaa ggcagaccga	660
30	aggctccaca ggtgtacacc attccacctc ccaaggagca gatggccaag gataaagtca	720
	gtctgacctg catgataaca gacttcttcc ctgaagacat tactgtggag tggcagtgga	780
	atgggcagcc agcggagaac tacaagaaca ctcagcccat catggacaca gatggctctt	840

acttcgtcta cagcaagctc aatgtgcaga agagcaactg ggaggcagga aatactttca 900
 cctgctctgt gttacatgag ggctgcaca accaccatac tgagaagagc ctctcccact 960
 ctcttggtaa atga 974
 <210> 83
 5 <211> 323
 <212> DNA
 <213> Sequência Artificial
 <220>
 <223> Reference Mouse Kappa Light Chain Constant Region (V00807)
 10 and Mouse Kappa Light Chain Constant Region Determined for 1D3,
 1F3, and 2B8 (derived from AJ strain mice)
 <400> 83
 gggctgatgc tgcaccaact gtatccatct tcccaccatc cagtgagcag ttaacatctg 60
 gaggtgcctc agtcgtgtgc ttcttgaaca acttctaccc caaagacatc aatgtcaagt 120
 15 ggaagattga tggcagtga cgcacaaaatg gcgtcctgaa cagttggact gatcaggaca 180
 gcaaagacag cacctacagc atgagcagca ccctcagtt gaccaaggac gagtatgaac 240
 gacataacag ctatacctgt gaggccactc acaagacatc aacttcaccc attgtcaaga 300
 gcttcaacag gaatgagtgt tag 323
 <210> 84
 20 <211> 323
 <212> DNA
 <213> Sequência Artificial
 <220>
 <223> Synthetic Mouse Kappa Light Chain Constant Region Determined
 25 for 1A3 containing one altered nucleotide as position 207 compared
 to 1D3, 1F3, and 2B8
 <400> 84
 gggctgatgc tgcaccaact gtatccatct tcccaccatc cagtgagcag ttaacatctg 60
 gaggtgcctc agtcgtgtgc ttcttgaaca acttctaccc caaagacatc aatgtcaagt 120
 30 ggaagattga tggcagtga cgcacaaaatg gcgtcctgaa cagttggact gatcaggaca 180
 gcaaagacag cacctacagc atgagcagca ccctcatggt gaccaaggac gagtatgaac 240
 gacataacag ctatacctgt gaggccactc acaagacatc aacttcaccc attgtcaaga 300

gcttcaacag gaatgagtgt tag 323

<210> 85

<211> 30

<212> DNA

5 <213> Sequência Artificial

<220>

<223> Synthetic oligonucleotide primer BD SMART II A

<400> 85

aagcagtggg atcaacgcag agtacgcggg 30

10 <210> 86

<211> 27

<212> DNA

<213> Sequência Artificial

<220>

15 <223> Synthetic oligonucleotide primer RACE CDS

<220>

<221> misc_feature

<222> (27)..(27)

<223> n is a, c, g, t or u

20 <400> 86

tttttttttt tttttttttt tttttvn 27

<210> 87

<211> 45

<212> DNA

25 <213> Sequência Artificial

<220>

<223> Synthetic oligonucleotide primer of Universal Primer Mix A

<400> 87

ctaatacgac tcactatagg gcaagcagtg gtatcaacgc agagt 45

30 <210> 88

<211> 22

<212> DNA

	<213> Seqüência Artificial	
	<220>	
	<223> Synthetic oligonucleotide primer of Universal Primer Mix A	
	<400> 88	
5	ctaatacgac tcactatagg gc	22
	<210> 89	
	<211> 21	
	<212> DNA	
	<213> Seqüência Artificial	
10	<220>	
	<223> Synthetic IgG1 Constant Region specific primer	
	<400> 89	
	tatgcaaggc ttacaaccac a	21
	<210> 90	
15	<211> 28	
	<212> DNA	
	<213> Seqüência Artificial	
	<220>	
	<223> Synthetic IgG1 Constant Region specific primer	
20	<400> 90	
	gccagtggat agacagatgg ggggtgctg	28
	<210> 91	
	<211> 27	
	<212> DNA	
25	<213> Seqüência Artificial	
	<220>	
	<223> synthetic oligonucleotide primer	
	<400> 91	
	ctcattcctg ttgaagctct tgacaat	27
30	<210> 92	
	<211> 23	
	<212> DNA	

<213> Seqüência Artificial
 <220>
 <223> Synthetic oligonucleotide primer
 <400> 92
 5 cgactgaggc acctccagat gtt 23
 <210> 93
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Seqüência Artificial
 10 <220>
 <223> Synthetic oligonucleotide primer T7
 <400> 93
 taatacgact cactataggg 20
 <210> 94
 15 <211> 17
 <212> DNA
 <213> Seqüência Artificial
 <220>
 <223> Synthetic oligonucleotide primer M13 Forward
 20 <400> 94
 gtaaaacgac ggccagt 17
 <210> 95
 <211> 18
 <212> DNA
 25 <213> Seqüência Artificial
 <220>
 <223> Synthetic oligonucleotide primer M13 Reverse
 <400> 95
 caggaaacag ctatgacc 18
 30 <210> 96
 <211> 63
 <212> DNA

<213> Seqüência Artificial
 <220>
 <223> Synthetic oligonucleotide forward primer
 <400> 96
 5 ggggacaagt ttgtacaaaa aagcaggctg ccacatgaa ctttgggctc agattgattt 60
 tcc 63
 <210> 97
 <211> 54
 <212> DNA
 10 <213> Seqüência Artificial
 <220>
 <223> Synthetic oligonucleotide reverse primer
 <400> 97
 . ggggaccact ttgtacaaga aagctgggtt catttaccag gagagtggga gagg 54
 15 <210> 98
 <211> 62
 <212> DNA
 <213> Seqüência Artificial
 <220>
 20 <223> Synthetic oligonucleotide forward primer
 <400> 98
 ggggacaagt ttgtacaaaa aagcaggctg ccacatggg atggagctat atcatcctct 60
 tt 62
 <210> 99
 25 <211> 53
 <212> DNA
 <213> Seqüência Artificial
 <220>
 <223> Synthetic oligonucleotide reverse primer
 30 <400> 99
 ggggaccact ttgtacaaga aagctgggtt catttaccag gagagtggga gag 53
 <210> 100

<211> 62
 <212> DNA
 <213> Seqüência Artificial
 <220>
 5 <223> Synthetic oligonucleotide forward primer
 <400> 100
 ggggacaagt ttgtacaaaa aagcaggctg ccacatgga atcacagact ctggtcttca 60
 ta 62
 <210> 101
 10 <211> 54
 <212> DNA
 <213> Seqüência Artificial
 <220>
 <223> Synthetic oligonucleotide reverse primer
 15 <400> 101
 ggggaccact ttgtacaaga aagctgggctc taacactcat tcctggtgaa gctc 54
 <210> 102
 <211> 30
 <212> DNA
 20 <213> Seqüência Artificial
 <220>
 <223> Synthetic oligonucleotide 5 prime hHGF NheI primer
 <400> 102
 actggctagc atgtgggtga ccaaactcct 30
 25 <210> 103
 <211> 46
 <212> DNA
 <213> Seqüência Artificial
 <220>
 30 <223> Synthetic oligonucleotide 3 prime hHGF NotI his tag primer
 <400> 103
 gtgatggtga tggatggtgc ggccgcatga ctggtgtacc ttatat 46

<210> 104
 <211> 30
 <212> DNA
 <213> Seqüência Artificial
 5 <220>
 <223> Synthetic oligonucleotide 5 prime His IgFc primer
 <400> 104
 actggcggcc gccatcacca tcacatcac 30
 <210> 105
 10 <211> 31
 <212> DNA
 <213> Seqüência Artificial
 <220>
 <223> Synthetic oligonucleotide 3 prime IgFc BamHI primer
 15 <400> 105
 actgggatcc tcactattta cccggggaca g 31
 <210> 106
 <211> 27
 <212> DNA
 20 <213> Seqüência Artificial
 <220>
 <223> Synthetic hHGF-Fc (G555E) sense primer
 <400> 106
 catgatgtcc acgaaagagg agatgag 27
 25 <210> 107
 <211> 27
 <212> DNA
 <213> Seqüência Artificial
 <220>
 30 <223> Synthetic hHGF-Fc (G555E) antisense primer
 <400> 107
 ctcatctcct ctttcgtgga catcatg 27

<210> 108
 <211> 37
 <212> DNA
 <213> Seqüência Artificial
 5 <220>
 <223> Synthetic hHGF-Fc (C561R) sense primer
 <400> 108
 ggaagaggag atgagaaacg caaacagggt ctcaatg 37
 <210> 109
 10 <211> 37
 <212> DNA
 <213> Seqüência Artificial
 <220>
 <223> Synthetic hHGF-Fc (C561R) antisense primer
 15 <400> 109
 cattgagaac ctgtttgctt ttctcatctc ctcttcc 37
 <210> 110
 <211> 29
 <212> DNA
 20 <213> Seqüência Artificial
 <220>
 <223> Synthetic Fragment 1 Primer for mHGF alpha chain 5 prime NheI
 <400> 110
 atcggctagc atgatgtggg ggaccaaac 29
 25 <210> 111
 <211> 36
 <212> DNA
 <213> Seqüência Artificial
 <220>
 30 <223> Synthetic Fragment 1 Primer for mHGF alpha chain 5 prime NheI
 <400> 111
 ggttttgttt tgttgacgcc caacatttac cctaag 36

<210> 112
 <211> 36
 <212> DNA
 <213> Seqüência Artificial
 5 <220>
 <223> Synthetic Fragment 2 Primer for hHGF beta chain aa V495-L585
 <400> 112
 ccaaaacaaa acaactgctg gttgtaaag ggattc 36
 <210> 113
 10 <211> 40
 <212> DNA
 <213> Seqüência Artificial
 <220>
 <223> Synthetic Fragment 2 Primer for hHGF beta chain aa V495-L585
 15 <400> 113
 tctagaccaa aattacttcg aacgagctgg acgttaggac 40
 <210> 114
 <211> 40
 <212> DNA
 20 <213> Seqüência Artificial
 <220>
 <223> Synthetic Fragment 3 Primer for mHGF beta chain C-terminus
 3 prime NotI
 <400> 114
 25 agatctgggtt ttaatgaagc ttgctcgacc tgcaatcctg 40
 <210> 115
 <211> 48
 <212> DNA
 <213> Seqüência Artificial
 30 <220>
 <223> Synthetic Fragment 3 Primer for mHGF beta chain C-terminus
 3 prime NotI

	<400> 115	
	cactaccact accactaccg ccggcgtgtt gaacatacag ttttaatg	48
	<210> 116	
	<211> 38	
5	<212> DNA	
	<213> Sequência Artificial	
	<220>	
	<223> Synthetic mutagenesis primer 1	
	<400> 116	
10	catcaccatc accatcacta agcgggtctg gtgccacg	38
	<210> 117	
	<211> 38	
	<212> DNA	
	<213> Sequência Artificial	
15	<220>	
	<223> Synthetic mutagenesis primer 2	
	<400> 117	
	cgtyggacca gaccgctta gtgatggtga tggatgatg	38
	<210> 118	
20	<211> 2922	
	<212> DNA	
	<213> Sequência Artificial	
	<220>	
	<223> nucleotide sequence of synthetic hHGF-Fc protein	
25	<400> 118	
	atgtgggtga ccaaactcct gccagccctg ctgctgcagc atgtcctcct gcatctcctc	60
	ctgctcccca tcgccatccc ctatgcagag ggacaaagga aaagaagaaa tacaattcat	120
	gaattcaaaa aatcagcaaa gactacccta atcaaaatag atccagcact gaagataaaa	180
	accaaaaaag tgaatactgc agaccaatgt gctaatagat gtactaggaa taaaggactt	240
30	ccattcactt gcaaggcttt tgtttttgat aaagcaagaa aacaatgcct ctggttcccc	300
	ttcaatagca tgtcaagtgg agtgaaaaaa gaatttggcc atgaatttga cctctatgaa	360
	aacaaagact acattagaaa ctgcatcatt ggtaaaggac gcagctacaa gggaacagta	420

	tctatcacta agagtggcat caaatgtcag ccctggagtt ccatgatacc acacgaacac	480
	agctttttgc cttcgagcta tcggggtaaa gacctacagg aaaactactg tcgaaatcct	540
	cgaggggaag aagggggacc ctggtgtttc acaagcaatc cagaggtacg ctacgaagtc	600
	tgtgacattc ctcagtgttc agaagttgaa tgcattgacct gcaatgggga gagttatcga	660
5	ggtctcatgg atcatacaga atcaggcaag atttgtcagc gctgggatca tcagacacca	720
	caccggcaca aattcttgcc tgaaagatat cccgacaagg gctttgatga taattattgc	780
	cgcaatcccg atggccagcc gaggccatgg tgctatactc ttgaccctca caccgctgg	840
	gagtactgtg caattaaaac atgctgtgac aatactatga atgacactga tgttcctttg	900
	gaaacaactg aatgcatcca aggtcaagga gaaggctaca ggggcaactgt caataccatt	960
10	tggaatggaa ttccatgtca gcgttgggat tctcagtatc ctcacgagca tgacatgact	1020
	cctgaaaatt tcaagtgcaa ggacctacga gaaaattact gccgaaatcc agatgggtct	1080
	gaatcacctt ggtgttttac cactgatcca aacatccgag ttggctactg ctcccaaatt	1140
	ccaaactgtg atatgtcaca tggacaagat tgttatcgtg ggaatggcaa aaattatatg	1200
	ggcaacttat cccaaacaag atctggacta acatgttcaa tgtgggacaa gaacatggaa	1260
15	gacttacatc gtcatatctt ctgggaacca gatgcaagta agctgaatga gaattactgc	1320
	cgaaatccag atgatgatgc tcatggacct tgggtctaca cgggaaatcc actcattcct	1380
	tgggattatt gccctatttc tcggttgtaa ggtgatacca cacctacaat agtcaattta	1440
	gaccatcccg taatatcttg tgccaaaacg aaacaattgc gagttgtaa tgggattcca	1500
	acacgaacaa acataggatg gatggttagt ttgagataca gaaataaaca tatctgcgga	1560
20	ggatcattga taaaggagag ttgggttctt actgcacgac agtgtttccc ttctcgagac	1620
	ttgaaagatt atgaagcttg gcttgaatt catgatgtcc acggaagagg agatgagaaa	1680
	tgcaaacagg ttctcaatgt ttcccagctg gtatatggcc ctgaaggatc agatctggtt	1740
	ttaatgaagc ttgccaggcc tgctgtcctg gatgattttg ttagtacgat tgatttacct	1800
	aattatggat gcacaattcc tgaaaagacc agttgcagtg tttatggctg gggctacact	1860
25	ggattgatca actatgatgg cctattacga gtggcacatc tctatataat gggaaatgag	1920
	aaatgcagcc agcatcatcg agggaaggtg actctgaatg agtctgaaat atgtgctggg	1980
	gctgaaaaga ttggatcagg accatgtgag ggggattatg gtggccact tgtttgtgag	2040
	caacataaaa tgagaatggt tcttgggtgc attgttcctg gtcgtggatg tgccattcca	2100
	aatcgtcctg gtatTTTTgt cggagtagca tattatgcaa aatggatata caaaattatt	2160
30	ttaacatata aggtaccaca gtcattcggc cgccatcacc atcaccatca ctccgagggt	2220
	ctgggtccac gcggtagtga caaaactcac acatgccac cgtgccagc acctgaactc	2280
	ctggggggac cgtcagtctt cctcttcccc ccaaaccaca aggacaccct catgatctcc	2340

cggaccctg aggtcacatg cgtggtggtg gacgtgagcc acgaagaccc tgaggtaag 2400
 ttcaactggt acgtggacgg cgtggaggtg cataatgcca agacaaagcc gcgggaggag 2460
 cagtacaaca gcacgtaccg tgtggtcagc gtcctcaccg tcctgcacca ggactggctg 2520
 aatggcaagg agtacaagtg caaggtctcc aacaagccc tcccagcccc catcgagaaa 2580
 5 accatctcca aagccaaagg gcagccccga gaaccacagg tgtacaccct gccccatcc 2640
 cgggaggaga tgaccaagaa ccaggtcagc ctgacctgcc tggtaaaagg cttctatccc 2700
 agcgacatcg ccgtggagtg ggagagcaat gggcagccgg agaacaacta caagaccagc 2760
 cctcccgtgc tggactccga cggctccttc ttctctata gcaagctcac cgtggacaag 2820
 agcaggtggc agcaggggaa cgtcttctca tgctccgtga tgcattgaggc tctgcacaac 2880
 10 cactacacgc agaagagcct ctccctgtcc ccgggtaaag ag 2922
 <210> 119
 <211> 919
 <212> PRT
 <213> Sequência Artificial
 15 <220>
 <223> amino acid sequence of synthetic hHGF-Fc protein (without signal
 sequence and pro domain)
 <400> 119
 Pro Ala Leu Lys Ile Lys Thr Lys Lys Val Asn Thr Ala Asp Gln Cys
 20 1 5 10 15
 Ala Asn Arg Cys Thr Arg Asn Lys Gly Leu Pro Phe Thr Cys Lys Ala
 20 25 30
 Phe Val Phe Asp Lys Ala Arg Lys Gln Cys Leu Trp Phe Pro Phe Asn
 35 40 45
 25 Ser Met Ser Ser Gly Val Lys Lys Glu Phe Gly His Glu Phe Asp Leu
 50 55 60
 Tyr Glu Asn Lys Asp Tyr Ile Arg Asn Cys Ile Ile Gly Lys Gly Arg
 65 70 75 80
 Ser Tyr Lys Gly Thr Val Ser Ile Thr Lys Ser Gly Ile Lys Cys Gln
 30 85 90 95
 Pro Trp Ser Ser Met Ile Pro His Glu His Ser Phe Leu Pro Ser Ser
 100 105 110

Tyr Arg Gly Lys Asp Leu Gln Glu Asn Tyr Cys Arg Asn Pro Arg Gly
 115 120 125
 Glu Glu Gly Gly Pro Trp Cys Phe Thr Ser Asn Pro Glu Val Arg Tyr
 130 135 140
 5 Glu Val Cys Asp Ile Pro Gln Cys Ser Glu Val Glu Cys Met Thr Cys
 145 150 155 160
 Asn Gly Glu Ser Tyr Arg Gly Leu Met Asp His Thr Glu Ser Gly Lys
 165 170 175
 Ile Cys Gln Arg Trp Asp His Gln Thr Pro His Arg His Lys Phe Leu
 10 180 185 190
 Pro Glu Arg Tyr Pro Asp Lys Gly Phe Asp Asp Asn Tyr Cys Arg Asn
 195 200 205
 Pro Asp Gly Gln Pro Arg Pro Trp Cys Tyr Thr Leu Asp Pro His Thr
 210 215 220
 15 Arg Trp Glu Tyr Cys Ala Ile Lys Thr Cys Ala Asp Asn Thr Met Asn
 225 230 235 240
 Asp Thr Asp Val Pro Leu Glu Thr Thr Glu Cys Ile Gln Gly Gln Gly
 245 250 255
 Glu Gly Tyr Arg Gly Thr Val Asn Thr Ile Trp Asn Gly Ile Pro Cys
 20 260 265 270
 Gln Arg Trp Asp Ser Gln Tyr Pro His Glu His Asp Met Thr Pro Glu
 275 280 285
 Asn Phe Lys Cys Lys Asp Leu Arg Glu Asn Tyr Cys Arg Asn Pro Asp
 290 295 300
 25 Gly Ser Glu Ser Pro Trp Cys Phe Thr Thr Asp Pro Asn Ile Arg Val
 305 310 315 320
 Gly Tyr Cys Ser Gln Ile Pro Asn Cys Asp Met Ser His Gly Gln Asp
 325 330 335
 Cys Tyr Arg Gly Asn Gly Lys Asn Tyr Met Gly Asn Leu Ser Gln Thr
 30 340 345 350
 Arg Ser Gly Leu Thr Cys Ser Met Trp Asp Lys Asn Met Glu Asp Leu
 355 360 365

His Arg His Ile Phe Trp Glu Pro Asp Ala Ser Lys Leu Asn Glu Asn
 370 375 380
 Tyr Cys Arg Asn Pro Asp Asp Ala His Gly Pro Trp Cys Tyr Thr
 385 390 395 400
 5 Gly Asn Pro Leu Ile Pro Trp Asp Tyr Cys Pro Ile Ser Arg Cys Glu
 405 410 415
 Gly Asp Thr Thr Pro Thr Ile Val Asn Leu Asp His Pro Val Ile Ser
 420 425 430
 Cys Ala Lys Thr Lys Gln Leu Arg Val Val Asn Gly Ile Pro Thr Arg
 10 435 440 445
 Thr Asn Ile Gly Trp Met Val Ser Leu Arg Tyr Arg Asn Lys His Ile
 450 455 460
 Cys Gly Gly Ser Leu Ile Lys Glu Ser Trp Val Leu Thr Ala Arg Gln
 465 470 475 480
 15 Cys Phe Pro Ser Arg Asp Leu Lys Asp Tyr Glu Ala Trp Leu Gly Ile
 485 490 495
 His Asp Val His Gly Arg Gly Asp Glu Lys Cys Lys Gln Val Leu Asn
 500 505 510
 Val Ser Gln Leu Val Tyr Gly Pro Glu Gly Ser Asp Leu Val Leu Met
 20 515 520 525
 Lys Leu Ala Arg Pro Ala Val Leu Asp Asp Phe Val Ser Thr Ile Asp
 530 535 540
 Leu Pro Asn Tyr Gly Cys Thr Ile Pro Glu Lys Thr Ser Cys Ser Val
 545 550 555 560
 25 Tyr Gly Trp Gly Tyr Thr Gly Leu Ile Asn Tyr Asp Gly Leu Leu Arg
 565 570 575
 Val Ala His Leu Tyr Ile Met Gly Asn Glu Lys Cys Ser Gln His His
 580 585 590
 Arg Gly Lys Val Thr Leu Asn Glu Ser Glu Ile Cys Ala Gly Ala Glu
 30 595 600 605
 Lys Ile Gly Ser Gly Pro Cys Glu Gly Asp Tyr Gly Gly Pro Leu Val
 610 615 620

tgttttacca ctgacccaaa catccgagtt ggctactgct ctcaaattcc caagtgtgac 1140
 gtgtcaagtg gacaagattg ttatcgtggc aatgggaaaa attacatggg caacttatcc 1200
 aaaacaaggt ctggacttac atgttccatg tgggacaaga atatggagga ttacaccgt 1260
 catatcttct gggagccaga tgctagcaaa ttgaataaga attactgccg gaatcctgat 1320
 5 gatgatgccc atggaccttg gtgctacacg gggaatcctc ttattccttg ggattattgc 1380
 cctatttccc gttgtgaagg agatactaca cctacaattg tcaatttga ccatcctgta 1440
 atatcctgtg ccaaaacaaa acaactgcgg gttgtaaag ggattccaac acgaacaaac 1500
 ataggatgga tggtagttt gagatacaga aataaacata tctgaggagg atcattgata 1560
 aaggagagtt gggttcttac tgcacgacag tgtttccctt ctcgagactt gaaagattat 1620
 10 gaagcttggc ttggaattca tgatgtccac ggaagaggag atgagaaatg caaacagggt 1680
 ctcaatgttt cccagctggt atatggcctt gaaggatcag atctggtttt aatgaagctt 1740
 gctcgacctg caatcctgga taactttgtc agtacaattg atttacctag ttatggttgt 1800
 acaatccctg aaaagaccac ttgcagtatt tacggctggg gctacactgg attgatcaac 1860
 gcggatggtt tattacgagt agctcatctg tatattatgg ggaatgagaa atgcagtcag 1920
 15 caccatcaag gcaaggtgac tttgaatgag tctgagttat gtgctggggc tgaaaagatt 1980
 ggatcaggac catgtgaggg agattatggt ggccactca tttgtgaaca acacaaaatg 2040
 agaatggttc ttggtgtcat tgttctggt cgtggatgtg ccatcccaa tcgtcctggt 2100
 atttttgttc gagtagcata ttatgcaaaa tggatacaca aagtaatttt gacatacaag 2160
 ttgtgcggcc gccatcacca tcaccatcac tccgcgggtc tggtgccacg cggtagtgac 2220
 20 aaaactcaca catgcccacc gtgcccagca cctgaactcc tggggggacc gtcagtcttc 2280
 ctcttcccc caaaaccaa ggacaccctc atgatctccc ggaccctga ggtcacatgc 2340
 gtggtggtgg acgtgagcca cgaagaccct gaggtcaagt tcaactggta cgtggacggc 2400
 gtggagggtc ataatgcaa gacaaagccg cgggaggagc agtacaacag cacgtaccgt 2460
 gtggtcagcg tcctcaccgt cctgcaccag gactggctga atggcaagga gtacaagtgc 2520
 25 aaggctcca acaaagccct cccagcccc atcgagaaaa ccatctcaa agccaaagg 2580
 cagccccgag aaccacaggt gtacaccctg ccccatccc gggaggagat gaccaagaac 2640
 caggtcagcc tgacctgct ggtcaaagc ttctatccc gcgacatgc cgtggagtgg 2700
 gagagcaatg ggcagccgga gaacaactac aagaccacgc ctcccgtgct ggactccgac 2760
 ggctcttct tcctctatag caagctcacc gtggacaaga gcaggtggca gcaggggaaac 2820
 30 gtcttctcat gctccgtgat gcatgaggct ctgcacaacc actacacgca gaagagcctc 2880
 tcctgtccc cgggtaaata g 2901

<211> 911

<212> PRT

<213> Sequência Artificial

<220>

5 <223> amino acid sequence of synthetic mhm-Fc Active form (signal sequence and pro domain removed)

<400> 121

Pro Leu Leu Lys Ile Lys Thr Lys Lys Val Asn Ser Ala Asp Glu Cys
 1 5 10 15
 10 Ala Asn Arg Cys Ile Arg Asn Arg Gly Phe Thr Phe Thr Cys Lys Ala
 20 25 30
 Phe Val Phe Asp Lys Ser Arg Lys Arg Cys Tyr Trp Tyr Pro Phe Asn
 35 40 45
 Ser Met Ser Ser Gly Val Lys Lys Gly Phe Gly His Glu Phe Asp Leu
 15 50 55 60
 Tyr Glu Asn Lys Asp Tyr Ile Arg Asn Cys Ile Ile Gly Lys Gly Gly
 65 70 75 80
 Ser Tyr Lys Gly Thr Val Ser Ile Thr Lys Ser Gly Ile Lys Cys Gln
 85 90 95
 20 Pro Trp Asn Ser Met Ile Pro His Glu His Ser Tyr Arg Gly Lys Asp
 100 105 110
 Leu Gln Glu Asn Tyr Cys Arg Asn Pro Arg Gly Glu Glu Gly Gly Pro
 115 120 125
 Trp Cys Phe Thr Ser Asn Pro Glu Val Arg Tyr Glu Val Cys Asp Ile
 25 130 135 140
 Pro Gln Cys Ser Glu Val Glu Cys Met Thr Cys Asn Gly Glu Ser Tyr
 145 150 155 160
 Arg Gly Pro Met Asp His Thr Glu Ser Gly Lys Thr Cys Gln Arg Trp
 165 170 175
 30 Asp Gln Gln Thr Pro His Arg His Lys Phe Leu Pro Glu Arg Tyr Pro
 180 185 190
 Asp Lys Gly Phe Asp Asp Asn Tyr Cys Arg Asn Pro Asp Gly Lys Pro

	195	200	205
	Arg Pro Trp Cys Tyr Thr Leu Asp Pro Asp Thr Pro Trp Glu Tyr Cys		
	210	215	220
	Ala Ile Lys Thr Cys Ala His Ser Ala Val Asn Glu Thr Asp Val Pro		
5	225	230	235 240
	Met Glu Thr Thr Glu Cys Ile Gln Gly Gln Gly Glu Gly Tyr Arg Gly		
	245	250	255
	Thr Ser Asn Thr Ile Trp Asn Gly Ile Pro Cys Gln Arg Trp Asp Ser		
	260	265	270
10	Gln Tyr Pro His Lys His Asp Ile Thr Pro Glu Asn Phe Lys Cys Lys		
	275	280	285
	Asp Leu Arg Glu Asn Tyr Cys Arg Asn Pro Asp Gly Ala Glu Ser Pro		
	290	295	300
	Trp Cys Phe Thr Thr Asp Pro Asn Ile Arg Val Gly Tyr Cys Ser Gln		
15	305	310	315 320
	Ile Pro Lys Cys Asp Val Ser Ser Gly Gln Asp Cys Tyr Arg Gly Asn		
	325	330	335
	Gly Lys Asn Tyr Met Gly Asn Leu Ser Lys Thr Arg Ser Gly Leu Thr		
	340	345	350
20	Cys Ser Met Trp Asp Lys Asn Met Glu Asp Leu His Arg His Ile Phe		
	355	360	365
	Trp Glu Pro Asp Ala Ser Lys Leu Asn Lys Asn Tyr Cys Arg Asn Pro		
	370	375	380
	Asp Asp Asp Ala His Gly Pro Trp Cys Tyr Thr Gly Asn Pro Leu Ile		
25	385	390	395 400
	Pro Trp Asp Tyr Cys Pro Ile Ser Arg Cys Glu Gly Asp Thr Thr Pro		
	405	410	415
	Thr Ile Val Asn Leu Asp His Pro Val Ile Ser Cys Ala Lys Thr Lys		
	420	425	430
30	Gln Leu Arg Val Val Asn Gly Ile Pro Thr Arg Thr Asn Ile Gly Trp		
	435	440	445
	Met Val Ser Leu Arg Tyr Arg Asn Lys His Ile Cys Gly Gly Ser Leu		

	450	455	460
	Ile Lys Glu Ser Trp Val	Leu Thr Ala Arg Gln Cys Phe Pro Ser Arg	
	465	470	475 480
	Asp Leu Lys Asp Tyr Glu Ala Trp Leu Gly Ile His Asp Val His Gly		
5	485	490	495
	Arg Gly Asp Glu Lys Cys Lys Gln Val Leu Asn Val Ser Gln Leu Val		
	500	505	510
	Tyr Gly Pro Glu Gly Ser Asp Leu Val Leu Met Lys Leu Ala Arg Pro		
	515	520	525
10	Ala Ile Leu Asp Asn Phe Val Ser Thr Ile Asp Leu Pro Ser Tyr Gly		
	530	535	540
	Cys Thr Ile Pro Glu Lys Thr Thr Cys Ser Ile Tyr Gly Trp Gly Tyr		
	545	550	555 560
	Thr Gly Leu Ile Asn Ala Asp Gly Leu Leu Arg Val Ala His Leu Tyr		
15	565	570	575
	Ile Met Gly Asn Glu Lys Cys Ser Gln His His Gln Gly Lys Val Thr		
	580	585	590
	Leu Asn Glu Ser Glu Leu Cys Ala Gly Ala Glu Lys Ile Gly Ser Gly		
	595	600	605
20	Pro Cys Glu Gly Asp Tyr Gly Gly Pro Leu Ile Cys Glu Gln His Lys		
	610	615	620
	Met Arg Met Val Leu Gly Val Ile Val Pro Gly Arg Gly Cys Ala Ile		
	625	630	635 640
	Pro Asn Arg Pro Gly Ile Phe Val Arg Val Ala Tyr Tyr Ala Lys Trp		
25	645	650	655
	Ile His Lys Val Ile Leu Thr Tyr Lys Leu Cys Gly Arg His His His		
	660	665	670
	His His His Ser Ala Gly Leu Val Pro Arg Gly Ser Asp Lys Thr His		
	675	680	685
30	Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val		
	690	695	700
	Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr		

Region)

<400> 122

atgaactttg ggctcagatt gatthtcctt gtccttgtht taaaaggthg gaagthtgaa 60

gtgcagctgg tggagthctgg gggaggctta gtgcagctg gaggthcctt gaaactctcc 120

5 tgtgcagcct ctgaattcac thtcagthac tattacatgt cthgggthctg ccagactcca 180

gagaagaggc tgcagthggg cgcatacatt agthctggth gtgthtagctc ctactatcca 240

gccagthtgga agggthcgatt caccatctcc agagacaath ccaagaacac cctgthacctg 300

caaatgagca gthctgaagth tgaggacaca gccatgthatt actgthgcaag acaaggggath 360

ggtthactacg gggactathg tathggactac thgggthcaag gaacctcagth caccgthctcc 420

10 thcagccaaaa cgacaccccc athctgthctat cactthggccc thggathctgth thcccaaaact 480

aactccathgg thaccctggg athgctggth aagggctath thcctgagcc agthgacagthg 540

acctggaact cthggathcct gthccagcggth gtgcacacct thccagctgth cctgthcagthct 600

gacctctaca ctctgagcag ctcagthgact gthccccctca gthcactggcc cagcagagacc 660

gthcacctgca acgthgcccc cccggccagc agthaccaagg thggacaagaa aathgthgccc 720

15 agggaththgth gthgthaaagc thgcatathg athagthcccag aagthathcath thgtctthcath 780

thccccccaa agccccagga thgthgthcacc athactctgth cthccthaagth cagthgthgth 840

gthggthagaca thcagcaagga thgathcccag gthccagthca gthgthgthgth agathgathgth 900

gaggtgcaca cagctcagac gthaaccccgg gaggagcagth thcaacagcath thtccgctca 960

gthcagthgaa thccccathcath gthaccagga thggthcaath gthcaaggath caaatgthcagth 1020

20 gthcaacagthg cagctthtccc thgccccathcath gthgaaaacca thtccccaaac caaaggcagth 1080

ccgaaggthc cagaggtgth caccathcca cthtccccagg agcagathggc caaggataaaa 1140

gthcagthctgth cctgthcathgath aacagactthc thtccctgaa gthcathactgth ggagthggcag 1200

thggaathggg agccagcggth gaactacaag aacactcagc cthcathcathgga cagagathggc 1260

thtthactthctg thctacagca gthcathgthg cagaaagacath actgggaggc aggaaathact 1320

25 thcacctgthc cthgthgthtaca thgagggcctg cacaaccacc athactgagaa gthgthcctctcc 1380

cactctcctg gthaaatga 1398

<210> 123

<211> 446

<212> PRT

30 <213> Sequência Artificial

<220>

<223> Protein Sequence Defining synthetic Full Length 1A3 Heavy

Chain Sequence (1A3 Heavy Chain Variable Region and IgG1 Constant Region) (without signal sequence)

<400> 123

5 1 5 10 15
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Glu Phe Thr Phe Ser Asn Tyr
 20 25 30
 Tyr Met Ser Trp Val Arg Gln Thr Pro Glu Lys Arg Leu Gln Trp Val
 35 40 45
 10 Ala Tyr Ile Ser Pro Gly Gly Gly Ser Ser Tyr Tyr Pro Ala Ser Val
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Ser Ser Leu Lys Ser Glu Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys
 15 85 90 95
 Ala Arg Gln Gly Asp Gly Tyr Tyr Gly Asp Tyr Ala Met Asp Tyr Trp
 100 105 110
 Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser Ala Lys Thr Thr Pro Pro
 115 120 125
 20 Ser Val Tyr Pro Leu Ala Pro Gly Ser Ala Ala Gln Thr Asn Ser Met
 130 135 140
 Val Thr Leu Gly Cys Leu Val Lys Gly Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr
 145 150 155 160
 Val Thr Trp Asn Ser Gly Ser Leu Ser Ser Gly Val His Thr Phe Pro
 25 165 170 175
 Ala Val Leu Gln Ser Asp Leu Tyr Thr Leu Ser Ser Ser Val Thr Val
 180 185 190
 Pro Ser Ser Thr Trp Pro Ser Glu Thr Val Thr Cys Asn Val Ala His
 195 200 205
 30 Pro Ala Ser Ser Thr Lys Val Asp Lys Lys Ile Val Pro Arg Asp Cys
 210 215 220
 Gly Cys Lys Pro Cys Ile Cys Thr Val Pro Glu Val Ser Ser Val Phe

<223> Nucleic Acid Sequence Encoding synthetic Full Length 1A3
Light Chain Sequence (1A3 Kappa Variable Region and Constant Region)

<400> 124

atgagtgtgc cactcaggt cctggggttg ctgctgctgt ggcttacaga tgccagatgt 60
5 gacatccaga tgactcagtc tccagcctcc ctatctgttt ctgtgggaga aactgtcacc 120
atcacatgtc gagcaagtga gaatatttat agtaatttag catggatca gcagaaacag 180
ggaaaatctc ctgagctcct ggtctatgct gcaacaaact tagcagatgg tgtgccatca 240
aggttcagtg gcagtgatc aggcacacag ttttcctca agatcaacag cctgcagtct 300
gaagattttg ggacttatta ctgtcaacat ttttggggta ctccgtacac gttcggaggg 360
10 gggaccaagc tggaaataaa acgggctgat gctgcaccaa ctgtatccat cttcccacca 420
tccagtgagc agttaacatc tggaggtgcc tcagtcgtgt gcttcttgaa caacttctac 480
cccaaagaca tcaatgtcaa gtggaagatt gatggcagtg aacgacaaaa tggcgtcctg 540
aacagttgga ctgatcagga cagcaaagac agcacctaca gcatgagcag caccctcatg 600
ttgaccaagg acgagtatga acgacataac agctatacct gtgaggccac tcacaagaca 660
15 tcaacttcac ccattgtcaa gagcttcaac aggaatgagt gttag 705

<210> 125

<211> 214

<212> PRT

<213> Sequência Artificial

20 <220>

<223> Protein Sequence Defining synthetic Full Length 1A3 Light
Chain Sequence (1A3 Kappa Variable Region and Constant Region)
(without signal sequence)

<400> 125

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

Ser Val Lys Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Thr Tyr
 20 25 30
 Trp Met His Trp Val Asn Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
 35 40 45
 5 Gly Glu Ile Asn Pro Thr Asn Gly His Thr Asn Tyr Asn Glu Lys Phe
 50 55 60
 Lys Ser Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys 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
 10 85 90 95
 Ala Arg Asn Tyr Val Gly Ser Ile Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
 100 105 110
 Thr Leu Thr Val Ser Ser Ala Lys Thr Thr Pro Pro Ser Val Tyr Pro
 115 120 125
 15 Leu Ala Pro Gly Ser Ala Ala Gln Thr Asn Ser Met Val Thr Leu Gly
 130 135 140
 Cys Leu Val Lys Gly Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Thr Trp Asn
 145 150 155 160
 Ser Gly Ser Leu Ser Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln
 20 165 170 175
 Ser Asp Leu Tyr Thr Leu Ser Ser Ser Val Thr Val Pro Ser Ser Thr
 180 185 190
 Trp Pro Ser Glu Thr Val Thr Cys Asn Val Ala His Pro Ala Ser Ser
 195 200 205
 25 Thr Lys Val Asp Lys Lys Ile Val Pro Arg Asp Cys Gly Cys Lys Pro
 210 215 220
 Cys Ile Cys Thr Val Pro Glu Val Ser Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro
 225 230 235 240
 Lys Pro Lys Asp Val Leu Thr Ile Thr Leu Thr Pro Lys Val Thr Cys
 30 245 250 255
 Val Val Val Asp Ile Ser Lys Asp Asp Pro Glu Val Gln Phe Ser Trp
 260 265 270

Phe Val Asp Asp Val Glu Val His Thr Ala Gln Thr Gln Pro Arg Glu
 275 280 285
 Glu Gln Phe Asn Ser Thr Phe Arg Ser Val Ser Glu Leu Pro Ile Met
 290 295 300
 5 His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Phe Lys Cys Arg Val Asn Ser
 305 310 315 320
 Ala Ala Phe Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Thr Lys Gly
 325 330 335
 Arg Pro Lys Ala Pro Gln Val Tyr Thr Ile Pro Pro Pro Lys Glu Gln
 10 340 345 350
 Met Ala Lys Asp Lys Val Ser Leu Thr Cys Met Ile Thr Asp Phe Phe
 355 360 365
 Pro Glu Asp Ile Thr Val Glu Trp Gln Trp Asn Gly Gln Pro Ala Glu
 370 375 380
 15 Asn Tyr Lys Asn Thr Gln Pro Ile Met Asp Thr Asp Gly Ser Tyr Phe
 385 390 395 400
 Val Tyr Ser Lys Leu Asn Val Gln Lys Ser Asn Trp Glu Ala Gly Asn
 405 410 415
 Thr Phe Thr Cys Ser Val Leu His Glu Gly Leu His Asn His His Thr
 20 420 425 430
 Glu Lys Ser Leu Ser His Ser Pro Gly Lys
 435 440
 <210> 128
 <211> 705
 25 <212> DNA
 <213> seqüência Artificial
 <220>
 <223> Nucleic Acid Sequence Encoding synthetic Full Length 2B8
 Light Chain Sequence (2B8 Kappa Variable Region and Constant Region)
 30 <400> 128
 atggaatcac agactctggt cttcatatcc atactgctct gggtatatgg tgctgatggg 60
 aacattgtaa tgaccaatc tcccaatcc atgtccatgt cagtaggaga gaggtcacc 120

ttgagctgca aggccagtga gaatgtggtt tcttatgtat cctggtatca acagaaacca 180
 gcgcagtctc ctaaactgct gatatacggg gcatccaacc ggaacactgg ggtccccgat 240
 cgcttcacag gcagtggatc tgcaacagat ttcactctga ccatcagcag tgtgcgggct 300
 gaagaccttg cagattatca ctgtgggcag agttacaact atccgtacac gttcggaggg 360
 5 gggaccaggc tggaataaaa acgggctgat gctgcaccaa ctgtatccat cttcccacca 420
 tccagtgagc agttaacatc tggaggtgcc tcagtcgtgt gcttcttgaa caacttctac 480
 cccaaagaca tcaatgtcaa gtggaagatt gatggcagtg aacgacaaaa tggcgtcctg 540
 aacagttgga ctgatcagga cagcaaagac agcacctaca gcatgagcag caccctcagc 600
 ttgaccaagg acgagtatga acgacataac agctatacct gtgaggccac tcacaagaca 660
 10 tcaacttcac ccattgtcaa gagcttcaac aggaatgagt gttag 705
 <210> 129
 <211> 214
 <212> PRT
 <213> Sequência Artificial
 15 <220>
 <223> Protein Sequence Defining synthetic Full Length 2B8 Light
 Chain Sequence (2B8 Kappa Variable Region and Constant Region)
 (without signal sequence)
 <400> 129
 20 Asn Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Lys Ser Met Ser Met Ser Val Gly
 1 5 10 15
 Glu Arg Val Thr Leu Ser Cys Lys Ala Ser Glu Asn Val Val Ser Tyr
 20 25 30
 Val Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Ala Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile
 25 35 40 45
 Tyr Gly Ala Ser Asn Arg Asn Thr Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly
 50 55 60
 Ser Gly Ser Ala Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Val Arg Ala
 65 70 75 80
 30 Glu Asp Leu Ala Asp Tyr His Cys Gly Gln Ser Tyr Asn Tyr Pro Tyr
 85 90 95
 Thr Phe Gly Gly Gly Thr Arg Leu Glu Ile Lys Arg Ala Asp Ala Ala

	100	105	110	
	Pro Thr Val Ser Ile Phe Pro Pro Ser Ser Glu Gln Leu Thr Ser Gly			
	115	120	125	
	Gly Ala Ser Val Val Cys Phe Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Lys Asp Ile			
5	130	135	140	
	Asn Val Lys Trp Lys Ile Asp Gly Ser Glu Arg Gln Asn Gly Val Leu			
	145	150	155	160
	Asn Ser Trp Thr Asp Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Met Ser			
	165	170	175	
10	Ser Thr Leu Thr Leu Thr Lys Asp Glu Tyr Glu Arg His Asn Ser Tyr			
	180	185	190	
	Thr Cys Glu Ala Thr His Lys Thr Ser Thr Ser Pro Ile Val Lys Ser			
	195	200	205	
	Phe Asn Arg Asn Glu Cys			
15	210			
	<210> 130			
	<211> 1386			
	<212> DNA			
	<213> Sequência Artificial			
20	<220>			
	<223> Nucleic Acid Sequence Encoding synthetic Full Length 2F8			
	Heavy Chain Sequence (2F8 Heavy Chain Variable Region and IgG1			
	Constant Region)			
	<400> 130			
25	atggaatgga gctgggtcct tctcttcctc ctgtcagtaa ctgcaggtgt ccaactgccag	60		
	gtccagctga agcagtctgg agctgagctg gtagggcctg ggacttcagt gaagatgtcc	120		
	tgcaaggctt ctggctacac cttcactacc tactatatac actgggtgaa tcagaggcct	180		
	ggacagggcc ttgagtggat tggaaagatt ggtcctggaa gtggtagtac ttactacaat	240		
	gagatgttca aagacaaggc cacattgact gtagacacat cctccagcac agcctacatg	300		
30	cagctcagca gcctgacatc tgacgactct gcggtctatt tctgtgcaag aaggggactg	360		
	ggacgtggct ttgactactg gggccaaggc accactctca cagtctctc agccaaaacg	420		
	acacccccat ctgtctatcc actggcccct ggatctgctg cccaaactaa ctccatggtg	480		

accctgggat gcctggtcaa gggctatttc cctgagccag tgacagtgac ctggaactct 540
 ggatcccctgt ccagcgggtgt gcacaccttc ccagctgtcc tgcagtctga cctctacact 600
 ctgagcagct cagtgactgt cccctccagc acctggccca gcgagaccgt cacctgcaac 660
 gttgcccacc cggccagcag caccaagggtg gacaagaaaa ttgtgcccag ggattgtggt 720
 5 tgtaagcctt gcatatgtac agtcccagaa gtatcatctg tcttcatctt cccccaaag 780
 cccaaggatg tgctcacctat tactctgact cctaagggtca cgtgtggttgt ggtagacatc 840
 agcaaggatg atcccagggt ccagttcagc tggttttag atgatgtgga ggtgcacaca 900
 gctcagacgc aaccccgga ggagcagttc aacagcactt tccgctcagt cagtgaactt 960
 cccatcatgc accaggactg gctcaatggc aaggagtcca aatgcagggt caacagtgca 1020
 10 gctttccctg ccccatcga gaaaaccatc tccaaaacca aaggcagacc gaaggctcca 1080
 caggtgtaca ccattccacc tccaaggag cagatggcca aggataaagt cagtctgacc 1140
 tgcataataa cagacttctt ccctgaagac attactgtgg agtggcagtg gaatgggcag 1200
 ccagcggaga actacaagaa cactcagccc atcatggaca cagatggctc ttacttcgtc 1260
 tacagcaagc tcaatgtgca gaagagcaac tgggaggcag gaaatacttt cacctgctct 1320
 15 gtgttacatg agggcctgca caaccacat actgagaaga gcctctcca ctctcctggt 1380
 aaatga 1386
 <210> 131
 <211> 442
 <212> PRT
 20 <213> seqüência Artificial
 <220>
 <223> Protein Sequence Defining synthetic Full Length 2F8 Heavy
 Chain Sequence (2F8 Heavy Chain Variable Region and IgG1 Constant
 Region) (without signal sequence)
 25 <400> 131
 Gln Val Gln Leu Lys Gln Ser Gly Ala Glu Leu Val Arg Pro Gly Thr
 1 5 10 15
 Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Thr Tyr
 20 25 30
 30 Tyr Ile His Trp Val Asn Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
 35 40 45
 Gly Lys Ile Gly Pro Gly Ser Gly Ser Thr Tyr Tyr Asn Glu Met Phe

atcttccac catccagtga gcagttaaca tctggaggtg cctcagtcgt gtgcttcttg 480
 aacaacttct accccaaaga catcaatgtc aagtggaaga ttgatggcag tgaacgacaa 540
 aatggcgtcc tgaacagttg gactgatcag gacagcaaag acagcaccta cagcatgagc 600
 agcaccctca cgttgaccaa ggacgagtat gaacgacata acagctatac ctgtgaggcc 660
 5 actcacaaga catcaacttc acccattgtc aagagcttca acaggaatga gtgttag 717
 <210> 133
 <211> 218
 <212> PRT
 <213> Seqüência Artificial
 10 <220>
 <223> Protein Sequence Defining synthetic Full Length 2F8 Light
 Chain Sequence (2F8 Kappa Variable Region and Constant Region)
 (without signal sequence)
 <400> 133
 15 Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly
 1 5 10 15
 Gln Arg Ala Thr Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gln Ser Val Asp Tyr Asp
 20 25 30
 Gly Asn Ser Tyr Ile Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro
 20 35 40 45
 Lys Val Leu Ile Tyr Val Ala Ser Asn Leu Glu Ser Gly Ile Pro Ala
 50 55 60
 Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Asn Ile His
 65 70 75 80
 25 Pro Val Glu Glu Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Ile
 85 90 95
 Glu Asp Pro Pro Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys Arg
 100 105 110
 Ala Asp Ala Ala Pro Thr Val Ser Ile Phe Pro Pro Ser Ser Glu Gln
 30 115 120 125
 Leu Thr Ser Gly Gly Ala Ser Val Val Cys Phe Leu Asn Asn Phe Tyr
 130 135 140

ccaaagccca aggatgtgct caccattact ctgactccta aggtcacgtg tgttggtgta 840
 gacatcagca aggatgatcc cgaggtccag ttcagctggt ttgtagatga tgtggagggtg 900
 cacacagctc agacgcaacc ccgggaggag cagttcaaca gcactttccg ctcagtcagt 960
 gaacttccca tcatgcacca ggactggctc aatggcaagg agttcaaagtg cagggtcaac 1020
 5 agtgcagctt tccctgcccc catcgagaaa accatctcca aaaccaaagg cagaccgaag 1080
 gctccacagg tgtacacat tccacctccc aaggagcaga tggccaagga taaagtcagt 1140
 ctgacctgca tgataacaga cttcttcctt gaagacatta ctgtggagtg gcagtggaat 1200
 gggcagccag cggagaacta caagaacact cagcccatca tggacacaga tggctcttac 1260
 ttcgtctaca gcaagctcaa tgtgcagaag agcaactggg aggcaggaaa tactttcacc 1320
 10 tgctctgtgt tacatgaggg cctgcacaac caccatactg agaagagcct ctcccactct 1380
 cctggtaaata ga 1392
 <210> 135
 <211> 444
 <212> PRT
 15 <213> Sequência Artificial
 <220>
 <223> Protein Sequence Defining synthetic Full Length 3B6 Heavy
 Chain Sequence (3B6 Heavy Chain Variable Region and IgG1 Constant
 egion) (without signal sequence)
 20 <400> 135
 Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Val Arg Pro Gly Ser
 1 5 10 15
 Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Val Phe Ser Ser Tyr
 20 25 30
 25 Trp Met Asn Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
 35 40 45
 Gly Gln Ile Tyr Pro Gly Asp Gly Asp Ser Asn Tyr Asn Gly Asn Phe
 50 55 60
 Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
 30 65 70 75 80
 Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys
 85 90 95

Ala Ser Gln Leu Gly Leu Arg Glu Asn Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln
 100 105 110
 Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser Ala Lys Thr Thr Pro Pro Ser Val
 115 120 125
 5 Tyr Pro Leu Ala Pro Gly Ser Ala Ala Gln Thr Asn Ser Met Val Thr
 130 135 140
 Leu Gly Cys Leu Val Lys Gly Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Thr
 145 150 155 160
 Trp Asn Ser Gly Ser Leu Ser Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val
 10 165 170 175
 Leu Gln Ser Asp Leu Tyr Thr Leu Ser Ser Ser Val Thr Val Pro Ser
 180 185 190
 Ser Thr Trp Pro Ser Glu Thr Val Thr Cys Asn Val Ala His Pro Ala
 195 200 205
 15 Ser Ser Thr Lys Val Asp Lys Lys Ile Val Pro Arg Asp Cys Gly Cys
 210 215 220
 Lys Pro Cys Ile Cys Thr Val Pro Glu Val Ser Ser Val Phe Ile Phe
 225 230 235 240
 Pro Pro Lys Pro Lys Asp Val Leu Thr Ile Thr Leu Thr Pro Lys Val
 20 245 250 255
 Thr Cys Val Val Val Asp Ile Ser Lys Asp Asp Pro Glu Val Gln Phe
 260 265 270
 Ser Trp Phe Val Asp Asp Val Glu Val His Thr Ala Gln Thr Gln Pro
 275 280 285
 25 Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Phe Arg Ser Val Ser Glu Leu Pro
 290 295 300
 Ile Met His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Phe Lys Cys Arg Val
 305 310 315 320
 Asn Ser Ala Ala Phe Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Thr
 30 325 330 335
 Lys Gly Arg Pro Lys Ala Pro Gln Val Tyr Thr Ile Pro Pro Pro Lys
 340 345 350

Glu Gln Met Ala Lys Asp Lys Val Ser Leu Thr Cys Met Ile Thr Asp
 355 360 365
 Phe Phe Pro Glu Asp Ile Thr Val Glu Trp Gln Trp Asn Gly Gln Pro
 370 375 380
 5 Ala Glu Asn Tyr Lys Asn Thr Gln Pro Ile Met Asp Thr Asp Gly Ser
 385 390 395 400
 Tyr Phe Val Tyr Ser Lys Leu Asn Val Gln Lys Ser Asn Trp Glu Ala
 405 410 415
 Gly Asn Thr Phe Thr Cys Ser Val Leu His Glu Gly Leu His Asn His
 10 420 425 430
 His Thr Glu Lys Ser Leu Ser His Ser Pro Gly Lys
 435 440
 <210> 136
 <211> 711
 15 <212> DNA
 <213> Sequência Artificial
 <220>
 <223> Nucleic Acid Sequence Encoding synthetic Full Length 3B6 Light
 Chain Sequence (3B6 Kappa Variable Region and Constant Region)
 20 <400> 136
 atggacatga ggaccctgc tcagtttctt ggaatcttgt tgctctggtt tccaggtatc 60
 aaatgtgaca tcaagatgac ccagttcca tcttccatgt atgcatctct aggagagaga 120
 gtcacaatca cttgcaaggc gagtcaggac attaaaagct atttaagctg gttccagcag 180
 aaaccagggg aatctcctaa gaccctgatc tatcgtgtaa acagattggt agatgggggtc 240
 25 ccatcaaggt tcagtggcag tggatctggg caagattctt ctctcacat caccagcctg 300
 gagaatgaag atatgggaat ttattattgt ctacagtatg atgagtttcc gttcacgttc 360
 ggaggggggga ccaagctgga aataaagcgg gctgatgctg caccaactgt atccatcttc 420
 ccaccatcca gtgagcagtt aacatctgga ggtgcctcag tcgtgtgctt cttgaacaac 480
 ttctaccca aagacatcaa tgtcaagtgg aagattgatg gcagtgaacg acaaaatggc 540
 30 gtcctgaaca gttggactga tcaggacagc aaagacagca cctacagcat gagcagcacc 600
 ctcacgttga ccaaggacga gtatgaacga cataacagct atacctgtga ggccactcac 660
 aagacatcaa cttcacccat tgtcaagagc ttcaacagga atgagtgtta g 711

<210> 137

<211> 214

<212> PRT

<213> Sequência Artificial

5 <220>

<223> Protein Sequence Defining synthetic Full Length 3B6 Light Chain Sequence (3B6 Kappa Variable Region and Constant Region) (without signal sequence)

<400> 137

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

	180	185	190	
	Thr Cys Glu Ala Thr His Lys Thr Ser Thr Ser Pro Ile Val Lys Ser			
	195	200	205	
	Phe Asn Arg Asn Glu Cys			
5	210			
	<210> 138			
	<211> 1361			
	<212> DNA			
	<213> Sequência Artificial			
10	<220>			
	<223> Nucleic Acid Sequence Encoding synthetic Full Length 3D11 Heavy Chain Sequence (3D11 Heavy Chain Variable Region and IgG1 Constant Region)			
	<400> 138			
15	atggctgtcc cgggtctggt cctctgcctg gttgcatttc caagctgtgt cctgtcccag			60
	gtacagctga aggagtcagg acctggcctg gtggcgcctt cacagagcct gtccatcact			120
	tgcactgtct ctgggttttc attaaccagc tatagtttac actgggttcg ccagcctcca			180
	ggaaagggtc tggaatggct gggagtaata tgggctggtg gaaacacaaa ttataattcg			240
	tctctcatgt ccagactgac catcaggaaa gacaactcca agagccaagt tttcttaaaa			300
20	atgaacagtc tgcaaaactga tgacacagcc atgtactact gtgccagaga gaggtttgct			360
	tactggggcc aagggactct ggtcactgtc tctgcagcca aaacgacacc cccatctgtc			420
	tatccactgg cccctggatc tgctgccaa actaactcca tggtgaccct gggatgcctg			480
	gtcaagggct atttccctga gccagtgaca gtgacctgga actctggatc cctgtccagc			540
	ggtgtgcaca ccttcccagc tgcctgcag tctgacctct acactctgag cagctcagtg			600
25	actgtcccct ccagcacctg gcccagcgag accgtcacct gcaacgttgc ccaccggcc			660
	agcagcacca aggtggacaa gaaaattgtg cccagggatt gtggttgtaa gccttgcata			720
	tgtacagtcc cagaagtatc atctgtcttc atcttcccc caaagccaa ggatgtgctc			780
	accattactc tgactcctaa ggtcacgtgt gttgtggtag acatcagcaa ggatgatccc			840
	gaggtccagt tcagctgggt tgtagatgat gtggaggtgc acacagctca gacgcaacc			900
30	cgggaggagc agttcaacag cactttccgc tcagtcagtg aacttccat catgcaccag			960
	gactggctca atggcaagga gttcaaatgc agggtaaca gtgcagcttt ccctgcccc			1020
	atcgagaaaa ccatctccaa aaccaaggc agaccgaagg ctccacaggt gtacaccatt			1080

ccacctcca aggagcagat ggccaaggat aaagtcagtc tgacctgcat gataacagac 1140
 ttcttcctg aagacattac tgtggagtgg cagtggaatg ggcagccagc ggagaactac 1200
 aagaacactc agcccatcat ggacacagat ggctcttact tcgtctacag caagctcaat 1260
 gtgcagaaga gcaactggga ggcaggaat actttcacct gctctgtgtt acatgagggc 1320
 5 ctgcacaacc accatactga tcccactctc ctggtaaatg a 1361
 <210> 139
 <211> 437
 <212> PRT
 <213> Seqüência Artificial
 10 <220>
 <223> Protein Sequence Defining synthetic Full Length 3D11 Heavy
 Chain Sequence (3D11 Heavy Chain variable Region and IgG1 Constant
 Region) (without signal sequence)
 <400> 139
 15 Gln Val Gln Leu Lys Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Ala Pro Ser Gln
 1 5 10 15
 Ser Leu Ser Ile Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu Thr Ser Tyr
 20 25 30
 Ser Leu His Trp Val Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Leu
 20 35 40 45
 Gly Val Ile Trp Ala Gly Gly Asn Thr Asn Tyr Asn Ser Ser Leu Met
 50 55 60
 Ser Arg Leu Thr Ile Arg Lys Asp Asn Ser Lys Ser Gln Val Phe Leu
 65 70 75 80
 25 Lys Met Asn Ser Leu Gln Thr Asp Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys Ala
 85 90 95
 Arg Glu Arg Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser
 100 105 110
 Ala Ala Lys Thr Thr Pro Pro Ser Val Tyr Pro Leu Ala Pro Gly Ser
 30 115 120 125
 Ala Ala Gln Thr Asn Ser Met Val Thr Leu Gly Cys Leu Val Lys Gly
 130 135 140

Asn Val Gln Lys Ser Asn Trp Glu Ala Gly Asn Thr Phe Thr Cys Ser
405 410 415
Val Leu His Glu Gly Leu His Asn His His Thr Glu Lys Ser Leu Ser
420 425 430

5 His Ser Pro Gly Lys
435
<210> 140
<211> 708
<212> DNA

10 <213> Sequência Artificial
<220>
<223> Nucleic Acid Sequence Encoding synthetic Full Length 3D11
Light Chain Sequence (3D11 Kappa Variable Region and Constant Region)
<400> 140

15 atggattttc aagtcagat tttcagcttc ctgctaataca gtgcctcagt caaaatatcc 60
agaggacaaa ttgttctcac ccagtctcca gcaatcatgt ctgcatatcc aggggagaag 120
gtcaccatga cctgcagtgc cagctcaagt gtaagttaca tgactggta ccagcagaag 180
tcaggcacct ccccaaaag atggatttat gacacatcca aactggcttc tggagtcctt 240
gctcgcttca gtggcagtgg gtctgggacc tcttactccc tcacaatcag tagtatggag 300

20 gctgaagatg ctgccactta ttactgccag cagtggagta gtaaccact cacgttcggt 360
gctgggacca agctggagct gaaacgggct gatgctgcac caactgtatc catcttcca 420
ccatccagtg agcagttaac atctggaggt gcctcagtcg tgtgcttctt gaacaacttc 480
taccctaaag acatcaatgt caagtggaag attgatggca gtgaacgaca aatggcgctc 540
ctgaacagtt ggactgatca ggacagcaa gacagcacct acagcatgag cagcacctc 600

25 acgttgacca aggacgagta tgaacgacat aacagctata cctgtgaggc cactcacaag 660
acatcaactt caccattgt caagagcttc aacaggaatg agtgtag 708
<210> 141
<211> 213
<212> PRT

30 <213> Sequência Artificial
<220>
<223> Protein Sequence Defining synthetic Full Length 3D11 Light

<211> 1398

<212> DNA

<213> Sequência Artificial

<220>

5 <223> Nucleic Acid Sequence Encoding synthetic Full Length 1D3 Heavy Chain Sequence (1D3 Heavy Chain Variable Region and IgG1 Constant Region)

<400> 142

	atgaactttg ggctcagatt gattttcctt gtccttgttt taaaagggtg gaagtgtgaa	60
	gtgcagctgg tggagtctgg gggaggctta gtgcagcctg gagggtcctt gaaactctcc	120
10	tgtgcagcct ctggattcac ttccagtac tattacatgt cttgggttcg ccagactcca	180
	gagaagaggc tggagtgggt cgatacatt agtagtggtg gtggtagcac ctactatcca	240
	gacagtgtga agggtcgatt caccatctcc cgagacaatg ccaagaacac cctgtacctg	300
	caaatgagca gtctgaagtc tgaggacaca gccatatatt actgtgtgag acaaggggat	360
	ggttattacg gggactatgc tatggactac tggggccaag gaacctcagt catcgtctcc	420
15	tcagccaaaa cgacaccccc atctgtctat ccactggccc ctggatctgc tgccaaact	480
	aactccatgg tgaccctggg atgcctggtc aagggtatt tccctgagcc agtgacagtg	540
	acctggaact ctggatccct gtccagcggg gtgcacacct tcccagctgt cctgcagtct	600
	gacctctaca ctctgagcag ctccagtact gtcccctcca gcacctggcc cagcgagacc	660
	gtcacctgca acgttgccca cccggccagc agcaccaagg tggacaagaa aattgtgccc	720
20	agggattgtg gttgtaagcc ttgcatatgt acagtcccag aagtatcatc tgtcttcatc	780
	ttcccccaa agcccaagga tgtgctcacc attactctga ctccaaagg cactgtgtgt	840
	gtggtagaca tcagcaagga tgatcccag gtccagttca gctggtttgt agatgatgtg	900
	gaggtgcaca cagctcagac gcaaccccg gaggagcagt tcaacagcac tttccgctca	960
	gtcagtgaac ttccatcat gcaccaggac tggctcaatg gcaaggagt caaatgcagg	1020
25	gtcaacagtg cagctttccc tgccccatc gagaaaacca tctccaaaac caaaggcaga	1080
	ccgaaggctc cacaggtgta caccattcca cctcccaagg agcagatggc caaggataaa	1140
	gtcagtctga cctgcatgat aacagacttc ttccctgaag acattactgt ggagtggcag	1200
	tggaatgggc agccagcggg gaactacaag aacctcagc ccatcatgga cacagatggc	1260
	tcttacttcg tctacagcaa gctcaatgtg cagaagagca actgggaggc aggaaatact	1320
30	ttcacctgct ctgtgttaca tgagggcctg cacaaccacc atactgagaa gagcctctcc	1380
	cactctctg gtaaatga	1398

<210> 143

<211> 446

<212> PRT

<213> Sequência Artificial

<220>

5 <223> Protein sequence Defining synthetic Full Length 1D3 Heavy chain sequence (1D3 Heavy Chain Variable Region and IgG1 Constant Region) (without signal sequence)

<400> 143

	Glu	Val	Gln	Leu	Val	Glu	Ser	Gly	Gly	Gly	Leu	Val	Gln	Pro	Gly	Gly
10	1				5						10				15	
	Ser	Leu	Lys	Leu	Ser	Cys	Ala	Ala	Ser	Gly	Phe	Thr	Phe	Ser	Asp	Tyr
					20					25					30	
	Tyr	Met	Ser	Trp	Val	Arg	Gln	Thr	Pro	Glu	Lys	Arg	Leu	Glu	Trp	Val
					35					40					45	
15	Ala	Tyr	Ile	Ser	Ser	Gly	Gly	Gly	Ser	Thr	Tyr	Tyr	Pro	Asp	Ser	Val
					50					55					60	
	Lys	Gly	Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Arg	Asp	Asn	Ala	Lys	Asn	Thr	Leu	Tyr
					65					70					75	
	Leu	Gln	Met	Ser	Ser	Leu	Lys	Ser	Glu	Asp	Thr	Ala	Ile	Tyr	Tyr	Cys
20					85					90					95	
	Val	Arg	Gln	Gly	Asp	Gly	Tyr	Tyr	Gly	Asp	Tyr	Ala	Met	Asp	Tyr	Trp
					100					105					110	
	Gly	Gln	Gly	Thr	Ser	Val	Ile	Val	Ser	Ser	Ala	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro
					115					120					125	
25	Ser	Val	Tyr	Pro	Leu	Ala	Pro	Gly	Ser	Ala	Ala	Gln	Thr	Asn	Ser	Met
					130					135					140	
	Val	Thr	Leu	Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr
					145					150					155	
	Val	Thr	Trp	Asn	Ser	Gly	Ser	Leu	Ser	Ser	Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro
30					165					170					175	
	Ala	Val	Leu	Gln	Ser	Asp	Leu	Tyr	Thr	Leu	Ser	Ser	Ser	Val	Thr	Val
					180					185					190	

Pro Ser Ser Thr Trp Pro Ser Glu Thr Val Thr Cys Asn Val Ala His
 195 200 205
 Pro Ala Ser Ser Thr Lys Val Asp Lys Lys Ile Val Pro Arg Asp Cys
 210 215 220
 5 Gly Cys Lys Pro Cys Ile Cys Thr Val Pro Glu Val Ser Ser Val Phe
 225 230 235 240
 Ile Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Val Leu Thr Ile Thr Leu Thr Pro
 245 250 255
 Lys Val Thr Cys Val Val Val Asp Ile Ser Lys Asp Asp Pro Glu Val
 10 260 265 270
 Gln Phe Ser Trp Phe Val Asp Asp Val Glu Val His Thr Ala Gln Thr
 275 280 285
 Gln Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Phe Arg Ser Val Ser Glu
 290 295 300
 15 Leu Pro Ile Met His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Phe Lys Cys
 305 310 315 320
 Arg Val Asn Ser Ala Ala Phe Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser
 325 330 335
 Lys Thr Lys Gly Arg Pro Lys Ala Pro Gln Val Tyr Thr Ile Pro Pro
 20 340 345 350
 Pro Lys Glu Gln Met Ala Lys Asp Lys Val Ser Leu Thr Cys Met Ile
 355 360 365
 Thr Asp Phe Phe Pro Glu Asp Ile Thr Val Glu Trp Gln Trp Asn Gly
 370 375 380
 25 Gln Pro Ala Glu Asn Tyr Lys Asn Thr Gln Pro Ile Met Asp Thr Asp
 385 390 395 400
 Gly Ser Tyr Phe Val Tyr Ser Lys Leu Asn Val Gln Lys Ser Asn Trp
 405 410 415
 Glu Ala Gly Asn Thr Phe Thr Cys Ser Val Leu His Glu Gly Leu His
 30 420 425 430
 Asn His His Thr Glu Lys Ser Leu Ser His Ser Pro Gly Lys
 435 440 445

<210> 144
 <211> 705
 <212> DNA
 <213> Sequência Artificial
 5 <220>
 <223> Nucleic Acid Sequence Encoding synthetic Full Length 1D3
 Light Chain Sequence (1D3 Kappa Variable Region and Constant Region)
 <400> 144
 atgagtgtgc cactcaggt cctggggttg ctgctgctgt ggcttacaga tgcagatgt 60
 10 gacatccaga tgactcagtc tccagcctcc ctatctgtat ctgtgggaga aactgtcacc 120
 atcacatgtc gaacaagtga gaatatttac agtaatttag cgtgggatca gcagaaacag 180
 ggaaaatctc ctcagctcct aatctatgct gcaacaaact tagcagatgg tgtgccatca 240
 aggttcagtg gcagtggatc aggcacacag ttttcctca ggatcaacag cctgcagtct 300
 gaagattttg ggaggtatta ctgtcaacat ttttggggga ctccgtacac gttcggaggg 360
 15 gggaccaaac tggaaataaa acgggctgat gctgcaccaa ctgtatccat cttcccacca 420
 tccagtgagc agttaacatc tggaggtgcc tcagtcgtgt gcttcttgaa caacttctac 480
 cccaaagaca tcaatgtcaa gtggaagatt gatggcagtg aacgacaaaa tggcgtcctg 540
 aacagttgga ctgatcagga cagcaaagac agcacctaca gcatgagcag caccctcag 600
 ttgaccaagg acgagtatga acgacataac agctatacct gtgaggccac tcacaagaca 660
 20 tcaacttcac ccattgtcaa gagcttcaac aggaatgagt gttag 705
 <210> 145
 <211> 214
 <212> PRT
 <213> Sequência Artificial
 25 <220>
 <223> Protein Sequence Defining synthetic Full Length 1D3 Light
 Chain Sequence (1D3 Kappa Variable Region and Constant Region)
 (without signal sequence)
 <400> 145
 30 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ser Val Ser Val Gly
 1 5 10 15
 Glu Thr Val Thr Ile Thr Cys Arg Thr Ser Glu Asn Ile Tyr Ser Asn

	20	25	30
	Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Gln Gly Lys Ser Pro Gln Leu Leu Ile		
	35	40	45
	Tyr Ala Ala Thr Asn Leu Ala Asp Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly		
5	50	55	60
	Ser Gly Ser Gly Thr Gln Phe Ser Leu Arg Ile Asn Ser Leu Gln Ser		
	65	70	75
	Glu Asp Phe Gly Arg Tyr Tyr Cys Gln His Phe Trp Gly Thr Pro Tyr		
	85	90	95
10	Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Ala Asp Ala Ala		
	100	105	110
	Pro Thr Val Ser Ile Phe Pro Pro Ser Ser Glu Gln Leu Thr Ser Gly		
	115	120	125
	Gly Ala Ser Val Val Cys Phe Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Lys Asp Ile		
15	130	135	140
	Asn Val Lys Trp Lys Ile Asp Gly Ser Glu Arg Gln Asn Gly Val Leu		
	145	150	155
	Asn Ser Trp Thr Asp Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Met Ser		
	165	170	175
20	Ser Thr Leu Thr Leu Thr Lys Asp Glu Tyr Glu Arg His Asn Ser Tyr		
	180	185	190
	Thr Cys Glu Ala Thr His Lys Thr Ser Thr Ser Pro Ile Val Lys Ser		
	195	200	205
	Phe Asn Arg Asn Glu Cys		
25	210		
	<210> 146		
	<211> 1398		
	<212> DNA		
	<213> Sequência Artificial		
30	<220>		
	<223> Nucleic Acid Sequence Encoding synthetic Full Length 1F3		
	Heavy Chain Sequence (1F3 Heavy Chain variable Region and IgG1		

Constant Region)

<400> 146

atgaactttg ggctcagatt gattttcctt gtccttgttt taaaagggtg gaagtgtgag 60
 gtgcagctgg tggagtctgg gggaggctta gtgcagtctg gagggtcctt gaaactctcc 120
 5 tgtgcggcct ctggattcac tttcagtaac tatttcatgt cttgggttcg ccagactcca 180
 gagaagagggc tggagtgggt cgcataatatt agtagtggtg gtggtagcac ctactatcca 240
 gacagtgtga agggctcgatt caccatctct agagacaatg ccaagaacac cctgtacctg 300
 caaatgagca gtctgaagtc tgaggacaca gccatgtatt actgtgtaag acaaggggat 360
 ggttactacg gggactatgc tatggactac tggggccaag gaacctcagt caccgtctcc 420
 10 tcagcAAAA cgacaccccc atctgtctat ccactggccc ctggatctgc tgccaaact 480
 aactccatgg tgaccctggg atgcctggtc aagggtatt tccctgagcc agtgacagtg 540
 acctggaact ctggatccct gtccagcggg gtgcacacct tcccagctgt cctgcagtct 600
 gacctctaca ctctgagcag ctcaagtact gtcccccca gcacctggcc cagcgagacc 660
 gtcacctgca acgttgccca cccggccagc agcaccaagg tggacaagaa aattgtgccc 720
 15 agggattgtg gttgtaagcc ttgcatatgt acagtcccag aagtatcatc tgtcttcatc 780
 tccccccaa agcccaagga tgtgctcacc attactctga ctccaaagg cactgtgtgt 840
 gtggtagaca tcagcaagga tgatcccagc gtccagttca gctggtttgt agatgatgtg 900
 gaggtgcaca cagctcagac gcaaccccgg gaggagcagt tcaacagcac tttccgctca 960
 gtcagtgaac ttccatcat gcaccaggac tggctcaatg gcaaggagt caaatgcagg 1020
 20 gtcaacagtg cagctttccc tgccccatc gagaaaacca tctccaaaac caaaggcaga 1080
 ccgaaggctc cacaggtgta caccattcca cctccaagg agcagatggc caaggataaa 1140
 gtcagtctga cctgcatgat aacagacttc ttcctgaag acattactgt ggagtggcag 1200
 tggaatgggc agccagcggg gaactacaag aactcagc ccatcatgga cacagatggc 1260
 tcttacttcg tctacagcaa gctcaatgtg cagaagagca actgggaggc aggaaatact 1320
 25 ttcacctgct ctgtgttaca tgaggcctg cacaaccacc atactgagaa gagcctctcc 1380
 cactctcctg gtaaatga 1398

<210> 147

<211> 446

<212> PRT

30 <213> Sequência Artificial

<220>

<223> Protein Sequence Defining synthetic Full Length 1F3 Heavy

Chain Sequence (1F3 Heavy Chain Variable Region and IgG1 Constant Region)
(without signal sequence)

<400> 147

5 1 5 10 15
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Ser Gly Gly
 Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asn Tyr
 20 25 30
 Phe Met Ser Trp Val Arg Gln Thr Pro Glu Lys Arg Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 10 Ala Tyr Ile Ser Ser Gly Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Pro Asp Ser Val
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Ser Ser Leu Lys Ser Glu Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys
 15 85 90 95
 Val Arg Gln Gly Asp Gly Tyr Tyr Gly Asp Tyr Ala Met Asp Tyr Trp
 100 105 110
 Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser Ala Lys Thr Thr Pro Pro
 115 120 125
 20 Ser Val Tyr Pro Leu Ala Pro Gly Ser Ala Ala Gln Thr Asn Ser Met
 130 135 140
 Val Thr Leu Gly Cys Leu Val Lys Gly Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr
 145 150 155 160
 Val Thr Trp Asn Ser Gly Ser Leu Ser Ser Gly Val His Thr Phe Pro
 25 165 170 175
 Ala Val Leu Gln Ser Asp Leu Tyr Thr Leu Ser Ser Ser Val Thr Val
 180 185 190
 Pro Ser Ser Thr Trp Pro Ser Glu Thr Val Thr Cys Asn Val Ala His
 195 200 205
 30 Pro Ala Ser Ser Thr Lys Val Asp Lys Lys Ile Val Pro Arg Asp Cys
 210 215 220
 Gly Cys Lys Pro Cys Ile Cys Thr Val Pro Glu Val Ser Ser Val Phe

<223> Nucleic Acid Sequence Encoding synthetic Full Length 1F3 Light Chain Sequence (1F3 Kappa Variable Region and Constant Region)

<400> 148

atgagtgtgc ccactcaggt cctgggggttg ctgctgctgt ggcttacaga tgccagatgt 60
 5 gacatccaga tgactcagtc tccagcctcc ctatctgtat ctgtgggaga aactgtcacc 120
 atcacatgtc gagcaagtga gaatatttac agtaatttag catggtatca gcagaaacag 180
 ggaaaatctc ctgagctcct ggtctatgat gcaacacact taccagatgg tgtgccatca 240
 aggttcagtg gcagtggatc aggcacacag ttttccctca agatcaacag cctgcagtct 300
 gaagattttg ggagttatta ctgtcaacat ttttggggta ctccgtacac gtttgaggagg 360
 10 gggaccagac tggaaattaa acgggctgat gctgcaccaa ctgtatccat cttcccacca 420
 tccagtgagc agttaacatc tggaggtgcc tcagtcgtgt gcttcttgaa caacttctac 480
 cccaaagaca tcaatgtcaa gtggaagatt gatggcagtg aacgacaaaa tggcgtcctg 540
 aacagttgga ctgatcagga cagcaaagac agcacctaca gcatgagcag caccctcacg 600
 ttgaccaagg acgagtatga acgacataac agctatacct gtgaggccac tcacaagaca 660
 15 tcaacttcac ccattgtcaa gagcttcaac aggaatgagt gtttag 705

<210> 149

<211> 214

<212> PRT

<213> Sequência Artificial

20 <220>

<223> Protein Sequence Defining synthetic Full Length 1F3 Light Chain Sequence (1F3 Kappa Variable Region and Constant Region)

(without signal sequence)

<400> 149

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

Ser Leu Lys Ile Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asn Tyr
 20 25 30
 Phe Met Ser Trp Val Arg Gln Thr Pro Glu Lys Arg Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 5 Ala Tyr Ile Ser Ser Gly Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Pro Asp Ser Val
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Ser Glu Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys
 10 85 90 95
 Val Arg Gln Gly Asp Gly Tyr Tyr Gly Asp Tyr Ala Met Asp Tyr Trp
 100 105 110
 Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser Ala Lys Thr Thr Pro Pro
 115 120 125
 15 Ser Val Tyr Pro Leu Ala Pro Gly Ser Ala Ala Gln Thr Asn Ser Met
 130 135 140
 Val Thr Leu Gly Cys Leu Val Lys Gly Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr
 145 150 155 160
 Val Thr Trp Asn Ser Gly Ser Leu Ser Ser Gly Val His Thr Phe Pro
 20 165 170 175
 Ala Val Leu Gln Ser Asp Leu Tyr Thr Leu Ser Ser Ser Val Thr Val
 180 185 190
 Pro Ser Ser Thr Trp Pro Ser Glu Thr Val Thr Cys Asn Val Ala His
 195 200 205
 25 Pro Ala Ser Ser Thr Lys Val Asp Lys Lys Ile Val Pro Arg Asp Cys
 210 215 220
 Gly Cys Lys Pro Cys Ile Cys Thr Val Pro Glu Val Ser Ser Val Phe
 225 230 235 240
 Ile Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Val Leu Thr Ile Thr Leu Thr Pro
 30 245 250 255
 Lys Val Thr Cys Val Val Val Asp Ile Ser Lys Asp Asp Pro Glu Val
 260 265 270

Gln Phe Ser Trp Phe Val Asp Asp Val Glu Val His Thr Ala Gln Thr
 275 280 285
 Gln Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Phe Arg Ser Val Ser Glu
 290 295 300
 5 Leu Pro Ile Met His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Phe Lys Cys
 305 310 315 320
 Arg Val Asn Ser Ala Ala Phe Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser
 325 330 335
 Lys Thr Lys Gly Arg Pro Lys Ala Pro Gln Val Tyr Thr Ile Pro Pro
 10 340 345 350
 Pro Lys Glu Gln Met Ala Lys Asp Lys Val Ser Leu Thr Cys Met Ile
 355 360 365
 Thr Asp Phe Phe Pro Glu Asp Ile Thr Val Glu Trp Gln Trp Asn Gly
 370 375 380
 15 Gln Pro Ala Glu Asn Tyr Lys Asn Thr Gln Pro Ile Met Asp Thr Asp
 385 390 395 400
 Gly Ser Tyr Phe Val Tyr Ser Lys Leu Asn Val Gln Lys Ser Asn Trp
 405 410 415
 Glu Ala Gly Asn Thr Phe Thr Cys Ser Val Leu His Glu Gly Leu His
 20 420 425 430
 Asn His His Thr Glu Lys Ser Leu Ser His Ser Pro Gly Lys
 435 440 445
 <210> 152
 <211> 705
 25 <212> DNA
 <213> seqüência Artificial
 <220>
 <223> Nucleic Acid Sequence Encoding synthetic Full Length 3A12 Light
 Chain Sequence (3A12 kappa variable Region and Constant Region)
 30 <400> 152
 atgagtgtgc cactcaggt cctggggttg ctgctgctgt ggcttacaga tgccagatgt 60
 gacatccaga tgactcagtc gccagcctcc ctatctgtat ctgtgggaga aactgtcacc 120

atcacatgtc gagcaagtga gaatatttac attaatttag catggtatca gcagaaacag 180
 ggaaaatctc ctcagctcct ggtccatgct gcaacaaagt tagcagatgg tgtgcatca 240
 aggttcagtg gcagtggatc aggcacacag tattccctca agatcaacag cctgcagtct 300
 gaagattttg ggagttatta ctgtcaacat ttttggggta ctccgtacac gttcggaggg 360
 5 gggaccaaac tagaaataaa acgggctgat gctgcaccaa ctgtatccat cttcccacca 420
 tccagtgagc agttaacatc tggaggtgcc tcagtcgtgt gcttcttgaa caacttctac 480
 cccaaagaca tcaatgtcaa gtggaagatt gatggcagtg aacgacaaaa tggcgtcctg 540
 aacagttgga ctgatcagga cagcaaagac agcacctaca gcatgagcag caccctcacg 600
 ttgaccaagg acgagtatga acgacataac agctatacct gtgaggccac tcacaagaca 660
 10 tcaacttcac ccattgtcaa gagcttcaac aggaatgagt gttag 705
 <210> 153
 <211> 214
 <212> PRT
 <213> Sequência Artificial
 15 <220>
 <223> Protein Sequence Defining synthetic Full Length 3A12 Light
 Chain Sequence (3A12 Kappa Variable Region and Constant Region)
 (without signal sequence)
 <400> 153
 20 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ser Val Ser Val Gly
 1 5 10 15
 Glu Thr Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Glu Asn Ile Tyr Ile Asn
 20 25 30
 Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Gln Gly Lys Ser Pro Gln Leu Leu Val
 25 35 40 45
 His Ala Ala Thr Lys Leu Ala Asp Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 Ser Gly Ser Gly Thr Gln Tyr Ser Leu Lys Ile Asn Ser Leu Gln Ser
 65 70 75 80
 30 Glu Asp Phe Gly Ser Tyr Tyr Cys Gln His Phe Trp Gly Thr Pro Tyr
 85 90 95
 Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Ala Asp Ala Ala

	100		105		110	
	Pro Thr Val Ser Ile Phe Pro Pro Ser Ser Glu Gln Leu Thr Ser Gly					
	115		120		125	
5	Gly Ala Ser Val Val Cys Phe Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Lys Asp Ile					
	130		135		140	
	Asn Val Lys Trp Lys Ile Asp Gly Ser Glu Arg Gln Asn Gly Val Leu					
	145		150		155	160
	Asn Ser Trp Thr Asp Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Met Ser					
		165		170		175
10	Ser Thr Leu Thr Leu Thr Lys Asp Glu Tyr Glu Arg His Asn Ser Tyr					
		180		185		190
	Thr Cys Glu Ala Thr His Lys Thr Ser Thr Ser Pro Ile Val Lys Ser					
		195		200		205
	Phe Asn Arg Asn Glu Cys					
15	210					
	<210> 154					
	<211> 1404					
	<212> DNA					
	<213> Sequência Artificial					
20	<220>					
	<223> Nucleic Acid Sequence Encoding synthetic Full Length Chimeric					
	2B8 Heavy Chain (Mouse Variable Region and Human IgG1 Constant Region)					
	(allotype G1m(17,1))					
	<400> 154					
25	atgggatgga gctatatcat cctctttttg gtagcaacag ctacagatgt cactcccag					60
	gtccaactgc agcagcctgg ggctgaactg gtgaagcctg ggacttcagt gaagctgtcc					120
	tgcaaggctt ctggctacac cttcaccacc tactggatgc actgggtgaa tcagaggcct					180
	ggacaaggcc ttgagtggat tggagagatt aatcctacca acggtcatac taactacaat					240
	gagaagttca agagcaaggc cacactgact gtagacaaat cctccagcac agcctacatg					300
30	caactcagca gcctgacatc tgaggactct gcggtctatt actgtgcaag aaactatggt					360
	ggtagcatct ttgactactg gggccaaggc accactctca ccgtctctc agcctccacc					420
	aagggcccat cggtcttccc cctggcacc cctccaaga gcacctctgg gggcacagcg					480

gccctgggct gcctggtcaa ggactacttc cccgaaccgg tgacggtgtc gtggaactca 540
 ggcgccctga ccagcggcgt gcacaccttc ccggctgtcc tacagtcctc aggactctac 600
 tccctcagca gcgtggtgac cgtgccctcc agcagcttgg gcacccagac ctacatctgc 660
 aacgtgaatc acaagcccag caacaccaag gtggacaaga aagttgagcc caaatcttgt 720
 5 gacaaaactc acacatgccc accgtgccc gcacctgaac tcctgggggg accgtcagtc 780
 ttctctttcc ccccaaaacc caaggacacc ctcatgatct cccggacccc tgaggtcaca 840
 tgcgtggtgg tggacgtgag ccacgaagac cctgaggtca agttcaactg gtacgtggac 900
 ggcgtggagg tgcataatgc caagacaaag ccgcgggagg agcagtacaa cagcacgtac 960
 cgtgtggtca gcgtcctcac cgtcctgcac caggactggc tgaatggcaa ggagtacaag 1020
 10 tgcaaggtct ccaacaaagc cctcccagcc cccatcgaga aaaccatctc caaagccaaa 1080
 gggcagcccc gagaaccaca ggtgtacacc ctgccccat cccgggatga gctgaccaag 1140
 aaccaggatc gcctgacctg cctggtcaaa ggcttctatc ccagcgacat cgccgtggag 1200
 tgggagagca atgggcagcc ggagaacaac tacaagacca cgcctcccgt gctggactcc 1260
 gacggctcct tcttctcta cagcaagctc accgtggaca agagcaggtg gcagcagggg 1320
 15 aacgtcttct catgctccgt gatgcatgag gctctgcaca accactacac gcagaagagc 1380
 ctctccctgt ctccgggtaa atga 1404
 <210> 155
 <211> 448
 <212> PRT
 20 <213> Seqüência Artificial
 <220>
 <223> Protein Sequence Defining synthetic Full Length Chimeric
 2B8 Heavy Chain (Chimeric 2B8 IgG1 (G1m(17,1) allotype) (without
 signal sequence)
 25 <400> 155
 Gln Val Gln Leu Gln Gln Pro Gly Ala Glu Leu Val Lys Pro Gly Thr
 1 5 10 15
 Ser Val Lys Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Thr Tyr
 20 25 30
 30 Trp Met His Trp Val Asn Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
 35 40 45
 Gly Glu Ile Asn Pro Thr Asn Gly His Thr Asn Tyr Asn Glu Lys Phe

gggaccaggc tggaataaaa acgaactgtg gctgcacat ctgtcttcat cttcccgcca 420
 tctgatgagc agttgaaatc tggaactgcc tctgttgtgt gcctgctgaa taacttctat 480
 cccagagagg ccaaagtaca gtggaagggtg gataacgccc tccaatcggg taactcccag 540
 gagagtgtca cagagcagga cagcaaggac agcacctaca gcctcagcag caccctgacg 600
 5 ctgagcaaag cagactacga gaaacacaaa gtctacgcct gcgaagtcac ccatcagggc 660
 ctgagctcgc ccgtcacaaa gagcttcaac aggggagagt gttga 705
 <210> 157
 <211> 214
 <212> PRT
 10 <213> Seqüência Artificial
 <220>
 <223> Protein Sequence Defining synthetic Full Length Chimeric 2B8
 Light Chain (Chimeric 2B8 Kappa) (without signal sequence)
 <400> 157
 15 Asn Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Lys Ser Met Ser Met Ser Val Gly
 1 5 10 15
 Glu Arg Val Thr Leu Ser Cys Lys Ala Ser Glu Asn Val Val Ser Tyr
 20 25 30
 Val Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Ala Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile
 20 35 40 45
 Tyr Gly Ala Ser Asn Arg Asn Thr Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly
 50 55 60
 Ser Gly Ser Ala Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Val Arg Ala
 65 70 75 80
 25 Glu Asp Leu Ala Asp Tyr His Cys Gly Gln Ser Tyr Asn Tyr Pro Tyr
 85 90 95
 Thr Phe Gly Gly Gly Thr Arg Leu Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
 100 105 110
 Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
 30 115 120 125
 Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
 130 135 140

Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
 145 150 155 160
 Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
 165 170 175
 5 Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
 180 185 190
 Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
 195 200 205
 Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 10 210
 <210> 158
 <211> 412
 <212> DNA
 <213> Sequência Artificial
 15 <220>
 <223> Nucleic Acid Sequence Encoding synthetic Humanized Hu2B8
 Hv1-f.1 Heavy Chain Variable Region
 <400> 158
 atggactgca cctggaggat cctcctcttg gtggcagcag ctacaggcac ccacgccgag 60
 20 gtccagctgg tacagtctgg ggctgaggtg aagaagcctg gggctacagt gaaaatctcc 120
 tgcaagttt ctggatacac cttcaccacc tactggatgc actgggtgca acaggcccct 180
 ggaaaagggc ttgagtggat gggagagatt aatcctacca acggtcatac taactacaat 240
 gagaagtcc agggcagagt caccataacc gcggacacgt ctacagacac agcctacatg 300
 gagctgagca gcctgagatc tgaggacacg gccgtgtatt actgtgcaac aaactatggt 360
 25 ggtagcatct ttgactactg gggccaagga accctgggtca cctctcctc ag 412
 <210> 159
 <211> 118
 <212> PRT
 <213> Sequência Artificial
 30 <220>
 <223> Protein Sequence Defining synthetic Humanized Hu2B8 Hv1-f.1
 Heavy Chain Variable Region (without signal sequence)

<400> 159
 Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15
 Thr Val Lys Ile Ser Cys Lys Val Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Thr Tyr
 5 20 25 30
 Trp Met His Trp Val Gln Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Met
 35 40 45
 Gly Glu Ile Asn Pro Thr Asn Gly His Thr Asn Tyr Asn Glu Lys Phe
 50 55 60
 10 Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Thr Ser Thr Asp Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Thr Asn Tyr Val Gly Ser Ile Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
 15 100 105 110
 Leu Val Thr Val Ser Ser
 115
 <210> 160
 <211> 992
 20 <212> DNA
 <213> Sequência Artificial
 <220>
 <223> Nucleic Acid Sequence Encoding synthetic Human IgG1 Heavy
 Chain Constant Region (G1m(17,1) allotype)
 25 <400> 160
 cctccaccaa gggcccatcg gtcttcccc tggcaccctc ctccaagagc acctctgggg 60
 gcacagcggc cctgggctgc ctggtcaagg actacttccc cgaaccggtg acggtgtcgt 120
 ggaactcagg cgccctgacc agcggcgtgc acaccttccc ggctgtccta cagtcctcag 180
 gactctactc cctcagcagc gtggtgaccg tgccctccag cagcttgggc acccagacct 240
 30 acatctgcaa cgtgaatcac aagcccagca acaccaaggt ggacaagaaa gttgagccca 300
 aatcttgtga caaaactcac acatgcccac cgtgcccagc acctgaactc ctggggggac 360
 cgtcagtctt cctcttcccc ccaaaaccca aggacaccct catgatctcc cggaccctg 420

aggtcacatg cgtggtggtg gacgtgagcc acgaagacct tgagggtcaag ttcaactggt 480
 acgtggacgg cgtggagggtg cataatgcca agacaaagcc gcgggaggag cagtacaaca 540
 gcacgtaccg tgtggtcagc gtcctcaccg tcctgcacca ggactggctg aatggcaagg 600
 agtacaagtg caaggtctcc aacaaagccc tcccagcccc catcgagaaa accatctcca 660
 5 aagccaaagg gcagccccga gaaccacagg tgtacaccct gccccatcc cgggatgagc 720
 tgaccaagaa ccaggtcagc ctgacctgcc tggtaaagg cttctatccc agcgacatcg 780
 ccgtggagtg ggagagcaat gggcagccgg agaacaacta caagaccag cctcccgtgc 840
 tggactccga cggctccttc ttcctctaca gcaagctcac cgtggacaag agcaggtggc 900
 agcaggggaa cgtcttctca tgctccgtga tgcatgaggc tctgcacaac cactacacgc 960
 10 agaagagcct ctccctgtct ccgggtaaat ga 992
 <210> 161
 <211> 330
 <212> PRT
 <213> Sequência Artificial
 15 <220>
 <223> Protein Sequence Defining synthetic Human IgG1 Heavy Chain
 Constant Region (G1m(17,1) allotype)
 <400> 161
 Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys
 20 1 5 10 15
 Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
 20 25 30
 Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
 35 40 45
 25 Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
 50 55 60
 Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr
 65 70 75 80
 Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
 30 85 90 95
 Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys
 100 105 110

Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro
 115 120 125
 Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys
 130 135 140
 5 Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp
 145 150 155 160
 Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu
 165 170 175
 Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu
 10 180 185 190
 His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn
 195 200 205
 Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly
 210 215 220
 15 Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu
 225 230 235 240
 Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
 245 250 255
 Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
 20 260 265 270
 Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
 275 280 285
 Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
 290 295 300
 25 Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
 305 310 315 320
 Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 325 330
 <210> 162
 30 <211> 1404
 <212> DNA
 <213> Seqüência Artificial

<220>

<223> Nucleic Acid Sequence Encoding synthetic Full Length Heavy
Chain Humanized Hu2B8 HV1f.1 Variable Region and Human IgG1
(G1m(17,1) allotype) Heavy Chain Constant Region

5 <400> 162
 atggactgca cctggaggat cctcctcttg gtggcagcag ctacaggcac ccacgccgag 60
 gtccagctgg tacagtctgg ggctgaggtg aagaagcctg gggctacagt gaaaatctcc 120
 tgcaaggttt ctggatacac cttcaccacc tactggatgc actgggtgca acaggcccct 180
 ggaaaagggc ttgagtggat gggagagatt aatcctacca acggtcatac taactacaat 240
 10 gagaagttcc agggcagagt caccataacc gcggacacgt ctacagacac agcctacatg 300
 gagctgagca gcctgagatc tgaggacacg gccgtgtatt actgtgcaac aaactatggt 360
 ggtagcatct ttgactactg gggccaagga accctgggtca ccgtctcctc agcctccacc 420
 aagggcccat cggctttccc cctggcacc cctccaaga gcacctctgg gggcacagcg 480
 gccctgggct gcctgggtcaa ggactacttc cccgaaccgg tgacgggtgc gtggaactca 540
 15 ggcgccctga ccagcggcgt gcacacctc cggcgtgtcc tacagtcctc aggactctac 600
 tccctcagca gcgtgggtgac cgtgccctcc agcagcttgg gcaccagac ctacatctgc 660
 aacgtgaatc acaagcccag caacaccaag gtggacaaga aagttgagcc caaatcttgt 720
 gacaaaactc acacatgccc accgtgccca gcacctgaac tcctgggggg accgtcagtc 780
 ttctcttccc ccccaaaacc caaggacacc ctcatgatct cccggacccc tgaggtcaca 840
 20 tgcgtgggtg tggacgtgag ccacgaagac cctgaggtca agttcaactg gtacgtggac 900
 ggcgtggagg tgcataatgc caagacaaag ccgcgggagg agcagtacaa cagcacgtac 960
 cgtgtgggtca gcgtcctcac cgtcctgcac caggactggc tgaatggcaa ggagtacaag 1020
 tgcaagggtct ccaacaaagc cctcccagcc cccatcgaga aaaccatctc caaagccaaa 1080
 gggcagcccc gagaaccaca ggtgtacacc ctgccccat cccgggatga gctgaccaag 1140
 25 aaccaggtca gcctgacctg cctggtcaaa ggcttctatc ccagcgacat cgccgtggag 1200
 tgggagagca atgggcagcc ggagaacaac tacaagacca cgcctcccgt gctggactcc 1260
 gacggctcct tcttctcta cagcaagctc accgtggaca agagcaggtg gcagcagggg 1320
 aacgtcttct catgctccgt gatgcatgag gctctgcaca accactacac gcagaagagc 1380
 ctctccctgt ctccgggtaa atga 1404
 30 <210> 163
 <211> 448
 <212> PRT

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> Protein Sequence Defining synthetic Full Length Heavy Chain
Humanized Hu2B8 Hv1f.1 Variable Region and Human IgG1 Heavy Chain
5 Constant Region (G1m(17,1) allotype) (without signal sequence)

<400> 163

	Glu	Val	Gln	Leu	Val	Gln	Ser	Gly	Ala	Glu	Val	Lys	Lys	Pro	Gly	Ala
	1				5									10		15
	Thr	Val	Lys	Ile	Ser	Cys	Lys	Val	Ser	Gly	Tyr	Thr	Phe	Thr	Thr	Tyr
10				20					25						30	
	Trp	Met	His	Trp	Val	Gln	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp	Met
				35				40						45		
	Gly	Glu	Ile	Asn	Pro	Thr	Asn	Gly	His	Thr	Asn	Tyr	Asn	Glu	Lys	Phe
				50				55					60			
15	Gln	Gly	Arg	Val	Thr	Ile	Thr	Ala	Asp	Thr	Ser	Thr	Asp	Thr	Ala	Tyr
	65					70						75				80
	Met	Glu	Leu	Ser	Ser	Leu	Arg	Ser	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys
						85						90				95
	Ala	Thr	Asn	Tyr	Val	Gly	Ser	Ile	Phe	Asp	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr
20					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	Ser	Ser	Lys	Ser	Thr	Ser	Gly	Gly	Thr	Ala	Ala	Leu	Gly
					130							135				140
25	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
30						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
 5 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
 10 275 280 285
 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
 15 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
 20 355 360 365
 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
 25 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 Lys
 30 435 440 445
 <210> 164
 <211> 412

<212> DNA

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> Nucleic Acid Sequence Encoding synthetic Humanized Hu2B8

5 Hv5a.1 Heavy Chain Variable Region

<400> 164

atgggggtcaa ccgccatcct cgccctcctc ctggctgttc tccaaggagt ctgtgccgaa 60

gtgcagctgg tgcagtctgg agcagaggtg aaaaagcccg gggagtctct gaggatctcc 120

tgtaagggtt ctggatacag ctttaccacc tactggatgc actgggtgcg ccagatgccc 180

10 gggaaaggcc tggagtggat gggggagatt aatcctacca acggtcatac taactacaat 240

ccgtccttcc aaggccacgt caccatctca gctgacaagt ccatcagcac tgcctacctg 300

cagtggagca gcctgaaggc ctcggacacc gccatgtatt actgtgagag aaactatggt 360

ggtagcatct ttgactactg gggccaagga accctgggtca ccgtctcctc ag 412

<210> 165

15 <211> 118

<212> PRT

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> Protein Sequence Defining synthetic Humanized Hu2B8 Hv5a.1

20 Heavy Chain Variable Region (without signal sequence)

<400> 165

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

1 5 10 15

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

25 20 25 30

Trp Met His Trp Val Arg Gln Met Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Met

35 40 45

Gly Glu Ile Asn Pro Thr Asn Gly His Thr Asn Tyr Asn Pro Ser Phe

50 55 60

30 Gln Gly His Val Thr Ile Ser Ala Asp Lys Ser Ile Ser Thr Ala Tyr

65 70 75 80

Leu Gln Trp Ser Ser Leu Lys Ala Ser Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys

	85	90	95	
	Ala Arg Asn Tyr Val Gly Ser Ile Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr			
	100	105	110	
	Leu Val Thr Val Ser Ser			
5	115			
	<210> 166			
	<211> 1404			
	<212> DNA			
	<213> Sequência Artificial			
10	<220>			
	<223> Nucleic Acid Sequence Encoding synthetic Full Length Humanized			
	Hu2B8 Hv5a.1 Heavy Chain Variable Region and Human IgG1 (G1m(17,1)			
	allotype) Heavy Chain Constant Region			
	<400> 166			
15	atgggggtcaa cgcctatcct cgccctcctc ctggctgttc tccaaggagt ctgtgccgaa	60		
	gtgcagctgg tgcagtctgg agcagaggtg aaaaagcccc gggagtctct gaggatctcc	120		
	tgtaagggtt ctggatacag ctttaccacc tactggatgc actgggtgcg ccagatgccc	180		
	gggaaaggcc tggagtggat gggggagatt aatcctacca acggtcatac taactacaat	240		
	ccgtccttcc aaggccacgt caccatctca gctgacaagt ccatcagcac tgcctacctg	300		
20	cagtggagca gcctgaaggc ctcggacacc gccatgtatt actgtgagag aaactatgtt	360		
	ggtagcatct ttgactactg gggccaagga accctgggtca ccgtctcctc agcctccacc	420		
	aaggggccat cggctcttccc cctggcacc cctccaaga gcacctctgg gggcacagcg	480		
	gccctgggct gcctgggtcaa ggactacttc cccgaaccgg tgacgggtgc gtggaactca	540		
	ggcgccttga ccagcggcgt gcacaccttc ccggctgtcc tacagtcctc aggactctac	600		
25	tccctcagca gcgtggtgac cgtgccctcc agcagcttgg gcacccagac ctacatctgc	660		
	aacgtgaatc acaagcccag caacaccaag gtggacaaga aagttgagcc caaatcttgt	720		
	gacaaaactc acacatgccc accgtgccc gcacctgaac tcctgggggg accgtcagtc	780		
	ttcctcttcc ccccaaaacc caaggacacc ctcgatgctt cccggacccc tgaggtcaca	840		
	tgcgtggtgg tggacgtgag ccacgaagac cctgaggtca agttcaactg gtacgtggac	900		
30	ggcgtggagg tgcataatgc caagacaaag ccgctggagg agcagtaca cagcacgtac	960		
	cgtgtgggtca gcgtcctcac cgtcctgcac caggactggc tgaatggcaa ggagtacaag	1020		
	tgcaaggctc ccaacaaagc cctcccagcc cccatcgaga aaacatctc caagccaaa	1080		

gggcagcccc gagaaccaca ggtgtacacc ctgcccccat cccgggatga gctgaccaag 1140
 aaccagggtca gcctgacctg cctgggtcaaa ggcttctatc ccagcgacat cgccgtggag 1200
 tgggagagca atgggcagcc ggagaacaac tacaagacca cgcctcccgt gctggactcc 1260
 gacggctcct tcttcctcta cagcaagctc accgtggaca agagcagggtg gcagcagggg 1320
 5 aacgtcttct catgctccgt gatgcatgag gctctgcaca accactacac gcagaagagc 1380
 ctctccctgt ctccgggtaa atga 1404
 <210> 167
 <211> 448
 <212> PRT
 10 <213> Sequência Artificial
 <220>
 <223> Protein Sequence Defining synthetic Full Length Humanized
 Hu2B8 Hv5a.1 Heavy Chain Variable Region and Human IgG1 (G1m(17,1)
 allotype) Heavy Chain Constant Region (without signal sequence)
 15 <400> 167
 Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Glu
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Ile Ser Cys Lys Gly Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Thr Tyr
 20 25 30
 20 Trp Met His Trp Val Arg Gln Met Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Met
 35 40 45
 Gly Glu Ile Asn Pro Thr Asn Gly His Thr Asn Tyr Asn Pro Ser Phe
 50 55 60
 Gln Gly His Val Thr Ile Ser Ala Asp Lys Ser Ile Ser Thr Ala Tyr
 25 65 70 75 80
 Leu Gln Trp Ser Ser Leu Lys Ala Ser Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Asn Tyr Val Gly Ser Ile Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
 100 105 110
 30 Leu 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

Ser Leu Lys Ile Ser Cys Lys Gly Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Thr Tyr
 20 25 30
 Trp Met His Trp Val Arg Gln Met Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Met
 35 40 45
 5 Gly Glu Ile Asn Pro Thr Asn Gly His Thr Asn Tyr Asn Pro Ser Phe
 50 55 60
 Gln Gly Gln Val Thr Ile Ser Ala Asp Lys Ser Ile Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Trp Ser Ser Leu Lys Ala Ser Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys
 10 85 90 95
 Ala Arg Asn Tyr Val Gly Ser Ile Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
 100 105 110
 Leu Val Thr Val Ser Ser
 115
 15 <210> 170
 <211> 1404
 <212> DNA
 <213> Sequência Artificial
 <220>
 20 <223> Nucleic Acid Sequence Encoding synthetic Full Length Humanized
 Hu2B8 Hv5-51.1 Heavy Chain Variable Region and Human IgG1 (G1m(17,1)
 allotype) Heavy Chain Constant Region
 <400> 170
 atgggggtcaa ccgccatcct cgcctcctc ctggctgttc tccaaggagt ctgtgccgaa 60
 25 gtgcagctgg tgcagtctgg agcagaggtg aaaaagcccg gggagtctct gaagatctcc 120
 tgtaaggggtt ctggatacag cttaccacc tactggatgc actgggtgcg ccagatgccc 180
 gggaaaggcc tggagtggat gggggagatt aatcctacca acggtcatac taactacaat 240
 ccgtccttcc aaggccaggt caccatctca gctgacaagt ccatcagcac tgcctacctg 300
 cagtggagca gcctgaaggc ctcggacacc gccatgtatt actgtgagaa aactatggt 360
 30 ggtagcatct ttgactactg gggccaagga accctggcca ccgtctcctc agcctccacc 420
 aagggcccat cggtcttccc cctggcacc cctccaaga gcacctctgg gggcacagcg 480
 gccctgggct gcctgggtcaa ggactacttc cccgaaccgg tgacggtgtc gtggaactca 540

ggcgccctga ccagcggcgt gcacaccttc ccggctgtcc tacagtcctc aggactctac 600
 tccctcagca gcgtggtgac cgtgccctcc agcagcttgg gcacccagac ctacatctgc 660
 aacgtgaatc acaagcccag caacaccaag gtggacaaga aagttgagcc caaatcttgt 720
 gacaaaactc acacatgccc accgtgccca gcacctgaac tcctgggggg accgtcagtc 780
 5 ttcctcttcc ccccaaaacc caaggacacc ctcatgatct cccggacccc tgaggtcaca 840
 tgcgtggtgg tggacgtgag ccacgaagac cctgagggtca agttcaactg gtacgtggac 900
 ggcgtggagg tgcataatgc caagacaaag ccgcgggagg agcagtacaa cagcacgtac 960
 cgtgtggtca gcgtcctcac cgtcctgcac caggactggc tgaatggcaa ggagtacaag 1020
 tgcaaggctt ccaacaaagc cctcccagcc cccatcgaga aaaccatctc caaagccaaa 1080
 10 gggcagcccc gagaaccaca ggtgtacacc ctgccccat cccgggatga gctgaccaag 1140
 aaccagggtca gcctgacctg cctggtcaaa ggcttctatc ccagcgacat cgccgtggag 1200
 tgggagagca atgggcagcc ggagaacaac tacaagacca cgctcccgt gctggactcc 1260
 gacggctcct tcttctctca cagcaagctc accgtggaca agagcagggtg gcagcagggg 1320
 aacgtcttct catgctccgt gatgcatgag gctctgcaca accactacac gcagaagagc 1380
 15 ctctccctgt ctccgggtaa atga 1404
 <210> 171
 <211> 448
 <212> PRT
 <213> Sequência Artificial
 20 <220>
 <223> Protein Sequence Defining synthetic Full Length Humanized
 Hu2B8 Hv5-51.1 Heavy Chain Variable Region and Human IgG1 (G1m(17,1)
 allotype) Heavy Chain Constant Region (without signal sequence)
 <400> 171
 25 Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Glu
 1 5 10 15
 Ser Leu Lys Ile Ser Cys Lys Gly Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Thr Tyr
 20 25 30
 Trp Met His Trp Val Arg Gln Met Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Met
 30 35 40 45
 Gly Glu Ile Asn Pro Thr Asn Gly His Thr Asn Tyr Asn Pro Ser Phe
 50 55 60

<211> 107

<212> PRT

<213> Seqüência Artificial

<220>

5 <223> Protein Sequence Defining synthetic Humanized Hu2B8 Kv1-39.1
Kappa Chain Variable Region (without signal sequence)

<400> 173

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

1 5 10 15

10 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Glu Asn Val Val Ser Tyr

20 25 30

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

35 40 45

Tyr Gly Ala Ser Asn Arg Asn Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly

15 50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro

65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gly Gln Ser Tyr Asn Tyr Pro Tyr

85 90 95

20 Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys

100 105

<210> 174

<211> 323

<212> DNA

25 <213> Seqüência Artificial

<220>

<223> Nucleic Acid Sequence Encoding synthetic Human Kappa Chain
Constant Region (Km(3) allotype) (allele 2)

<400> 174

30 gaactgtggc tgcaccatct gtcttcatct tcccgccatc tgatgagcag ttgaaatctg 60

gaactgcctc tgttgtgtgc ctgctgaata acttctatcc cagagaggcc aaagtacagt 120

ggaaggtgga taacgccctc caatcgggta actcccagga gagtgtcaca gagcaggaca 180

gcaaggacag cacctacagc ctcagcagca ccctgacgct gagcaaagca gactacgaga 240
 aacacaaaagt ctacgcctgc gaagtcaccc atcagggcct gagctcgccc gtcacaaaaga 300
 gcttcaacag gggagagtgt tga 323
 <210> 175
 5 <211> 107
 <212> PRT
 <213> Sequência Artificial
 <220>
 <223> Protein Sequence Defining synthetic Human Kappa Chain
 10 Constant Region (Km(3) allotype) (allele 2)
 <400> 175
 Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu
 1 5 10 15
 Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe
 15 20 25 30
 Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln
 35 40 45
 Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser
 50 55 60
 20 Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu
 65 70 75 80
 Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser
 85 90 95
 Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 25 100 105
 <210> 176
 <211> 711
 <212> DNA
 <213> Sequência Artificial
 30 <220>
 <223> Nucleic Acid Sequence Encoding synthetic Full Length Humanized
 Hu2B8 Kv-39.1 Light Chain Variable Region and Human Kappa Chain

Constant Region (Km(3) allotype) (allele 2)

<400> 176

atggacatga gggccccgc tcagctcctg gggctcctgc tactctggct ccgaggtgcc 60

agatgtgaca tccagatgac ccagctctcca tcctccctgt ctgcatctgt aggagacaga 120

5 gtcaccatca cttgcaaggc cagtgagaat gtggtttctt atgtatcctg gtatcagcag 180

aaaccagga aagcccctaa gctcctgac tatggggcat ccaaccgaa cactggggtc 240

ccatcaaggt tcagtggcag tggatctggg acagatttca ctctcacat cagcagtctg 300

caacctgaag attttgcaac ttactactgt gggcagagtt acaactatcc gtacacgttt 360

ggccagggga ccaagctgga gatcaaacga actgtggctg caccatctgt cttcatcttc 420

10 ccgccatctg atgagcagtt gaaatctgga actgcctctg ttgtgtgcct gctgaataac 480

ttctatccca gagaggcca agtacagtgg aaggtggata acgccctcca atcgggtaac 540

tcccaggaga gtgtcacaga gcaggacagc aaggacagca cctacagcct cagcagcacc 600

ctgacgctga gcaaagcaga ctacgagaaa cacaaagtct acgcctgcga agtcacccat 660

cagggcctga gctcgcccgt cacaaagagc ttcaacaggg gagagtgttg a 711

15 <210> 177

<211> 214

<212> PRT

<213> Sequência Artificial

<220>

20 <223> Protein Sequence Defining synthetic Full Length Humanized
Hu2B8 Kv1-39.1 Light Chain Variable Region and Human Kappa Chain
Constant Region (Km(3) allotype) (allele 1)

<400> 177

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

25 1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

30 Tyr Gly Ala Ser Asn Arg Asn Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly

50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro

gaagattttg cagtttatta ctgtgggcag agttacaact atccgtacac gtttggccag 360
 gggaccaagc tggagatcaa ac 382
 <210> 179
 <211> 107
 5 <212> PRT
 <213> Seqüência Artificial
 <220>
 <223> Protein Sequence Defining synthetic Humanized Hu2B8 Kv3-15.1
 Light Chain Variable Region (without signal sequence)
 10 <400> 179
 Glu Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Val Ser Pro Gly
 1 5 10 15
 Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Lys Ala Ser Glu Asn Val Val Ser Tyr
 20 25 30
 15 Val Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile
 35 40 45
 Tyr Gly Ala Ser Asn Arg Asn 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
 20 65 70 75 80
 Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gly Gln Ser Tyr Asn Tyr Pro Tyr
 85 90 95
 Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105
 25 <210> 180
 <211> 705
 <212> DNA
 <213> Seqüência Artificial
 <220>
 30 <223> Nucleic Acid Encoding synthetic Full Length Humanized Hu2B8
 kv3-15.1 Light Chain Variable Region and Human Kappa Chain Constant
 Region (Km(3) allotype) (allele 2)

<400> 180

atggaagccc cagcgcagct tctcttcctc ctgctactct ggctcccaga taccactgga 60
gaaatagtga tgacgcagtc tccagccacc ctgtctgtgt ctccagggga aagagccacc 120
ctctcctgca aggccagtga gaatgtgggt tcttatgtat cctggtacca gcagaaacct 180
5 ggccaggctc ccaggctcct catctatggg gcatccaacc ggaacactgg tatcccagcc 240
aggttcagtg gcagtgggtc tgggacagag ttcactctca ccatcagcag cctgcagtct 300
gaagattttg cagtttatta ctgtgggcag agttacaact atccgtacac gtttggccag 360
gggaccaagc tggagatcaa acgaactgtg gctgcacat ctgtcttcat cttcccgcca 420
tctgatgagc agttgaaatc tggaaactgcc tctgttgtgt gcctgctgaa taacttctat 480
10 cccagagagg ccaaagtaca gtggaaggtg gataacgcc tccaatcggg taactcccag 540
gagagtgtca cagagcagga cagcaaggac agcacctaca gcctcagcag caccctgacg 600
ctgagcaaag cagactacga gaaacacaaa gtctacgcct gcgaagtcac ccatcagggc 660
ctgagctcgc ccgtcacaaa gagcttcaac aggggagagt gttga 705

<210> 181

15 <211> 214
<212> PRT
<213> Sequência Artificial
<220>
<223> Protein Sequence Defining synthetic Humanized Hu2B8 Kv3-15.1

20 Light Chain Variable Region and Human Kappa Chain Constant Region
(Km(3) allotype) (allele 2) (without signal sequence)

<400> 181

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

ggatcaatat tcgattactg gggccaaggc actctcctca cagtcagctc ag

412

<210> 183

<211> 118

<212> PRT

5 <213> Sequência Artificial

<220>

<223> Protein Sequence Defining synthetic Humanized LR2B8HC Heavy Chain variable Region (without signal sequence)

<400> 183

10 Gln Val Gln Leu Val Gln Pro Gly Ala Glu Val Val Lys Pro Gly Thr

1 5 10 15

Ser Val Lys Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Thr Tyr

20 25 30

Trp Met His Trp Val Asn Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile

15 35 40 45

Gly Glu Ile Asn Pro Thr Asn Gly His Thr Asn Tyr Asn Glu Lys Phe

50 55 60

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

65 70 75 80

20 Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys

85 90 95

Ala Arg Asn Tyr Val Gly Ser Ile Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr

100 105 110

Leu Leu Thr Val Ser Ser

25 115

<210> 184

<211> 992

<212> DNA

<213> Sequência Artificial

30 <220>

<223> Nucleic Acid Sequence Encoding synthetic Human IgG1 Heavy Chain Constant Region (G1m(3) allotype) (allele 1)

<400> 184

ccagcaca aa gggcccatcg gtcttcccc tggcaccctc ctccaagagc acctctgggg 60

gcacagcggc cctgggctgc ctggtcaagg actacttccc cgaaccgggtg acggtgtcgt 120

ggaactcagg cgccctgacc agcggcgtgc acaccttccc ggctgtccta cagtctcag 180

5 gactctactc cctcagcagc gtggtgaccg tgcctccag cagcttgggc acccagacct 240

acatctgcaa cgtgaatcac aagcccagca acaccaaggt ggacaagaga gttgagccca 300

aatcttgtga caaaactcac acatgtccac cgtgccagc acctgaactc ctggggggac 360

cgtcagtctt cctcttcccc ccaaaacca aggacacct catgatctcc cggaccctg 420

aggtcacatg cgtggtggtg gacgtgagcc acgaagacc tgaggtaag ttcaactggt 480

10 acgtggacgg cgtggagggtg cataatgcca agacaaagcc gcgggaggag cagtacaaca 540

gcacgtaccg tgtggtcagc gtcctcaccg tcctgcacca ggactggctg aatggcaagg 600

agtacaagtg caaggtctcc aacaaagccc tcccagcccc catcgagaaa accatctcca 660

aagccaaagg gcagccccga gaaccacagg tgtacacct gccccatcc cgggaggaga 720

tgaccaagaa ccaggtcagc ctgacctgcc tggtaaaagg cttctatccc agcgacatcg 780

15 ccgtggagtg ggagagcaat gggcagccgg agaacaacta caagaccag cctcccgtgc 840

tggactccga cggtccttc ttcctctata gcaagctcac cgtggacaag agcaggtggc 900

agcaggggaa cgtcttctca tgctccgtga tgcattgaggc tctgcacaac cactacacgc 960

agaagagcct ctcctgtcc ccgggtaaat ga 992

<210> 185

20 <211> 330

<212> PRT

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> Protein Sequence Defining synthetic Human IgG1 Heavy Chain

25 Constant Region (G1m(3) allotype) (allele 1 or 2)

<400> 185

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys

1 5 10 15

Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr

30 20 25 30

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser

35 40 45

Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
 50 55 60
 Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr
 65 70 75 80
 5 Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
 85 90 95
 Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys
 100 105 110
 Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro
 115 120 125
 Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys
 130 135 140
 Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp
 145 150 155 160
 15 Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu
 165 170 175
 Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu
 180 185 190
 His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn
 195 200 205
 Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly
 210 215 220
 Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu
 225 230 235 240
 25 Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
 245 250 255
 Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
 260 265 270
 Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
 275 280 285
 30 Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
 290 295 300

aaccagggtca gcctgacctg cctggtcaaa ggcttctatc ccagcgacat cgccgtggag 1200
tgggagagca atgggcagcc ggagaacaac tacaagacca cgcctcccgt gctggactcc 1260
gacggctcct tcttctcta tagcaagctc accgtggaca agagcaggtg gcagcagggg 1320
aacgtcttct catgctccgt gatgcatgag gctctgcaca accactacac gcagaagagc 1380
5 ctctccctgt ccccggttaa atga 1404
<210> 187
<211> 448
<212> PRT
<213> Sequência Artificial
10 <220>
<223> Protein Sequence Defining synthetic Full Length Heavy Chain
Humanized LR2B8HC Heavy Chain Variable Region and Human IgG1 Heavy
Chain Constant Region (G1m(3) allotype) (allele 1) (without signal
sequence)
15 <400> 187
Gln Val Gln Leu Val Gln Pro Gly Ala Glu Val Val Lys Pro Gly Thr
1 5 10 15
Ser Val Lys Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Thr Tyr
20 25 30
20 Trp Met His Trp Val Asn Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45
Gly Glu Ile Asn Pro Thr Asn Gly His Thr Asn Tyr Asn Glu Lys Phe
50 55 60
Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
25 65 70 75 80
Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95
Ala Arg Asn Tyr Val Gly Ser Ile Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110
30 Leu Leu 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

Ser Val Lys Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Thr Tyr
 20 25 30
 Trp Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
 35 40 45
 5 Gly Glu Ile Asn Pro Thr Asn Gly His Thr Asn Tyr Asn Gln Lys Phe
 50 55 60
 Gln Gly Arg Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 10 85 90 95
 Ala Arg Asn Tyr Val Gly Ser Ile Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
 100 105 110
 Leu Leu Thr Val Ser Ser
 115
 15 <210> 190
 <211> 1404
 <212> DNA
 <213> Sequência Artificial
 <220>
 20 <223> Nucleic Acid Sequence Encoding synthetic Full Length Heavy
 Chain Humanized LRM2B8HC Heavy Chain Variable Region and Human IgG1
 Heavy Chain Constant Region (G1m(3) allotype) (allele 1)
 <400> 190
 atggggttggg catatattat actctttctc gtagccaccg ccaccgacgt acactctcag 60
 25 gttcaactcg tacaaccgg cgccgaagtc aagaaaccag gaacatcagt caaactctca 120
 tgtaaagcaa gcggatacac ctttactact tattggatgc attgggtaag acaagcccc 180
 ggacaaggac tcgaatggat aggcgaaata aatcccacta atggacatac aaattataat 240
 caaaaatttc aaggacgagc tacactcacc gtcgataaat caacctcaac cgcatacatg 300
 gaactcagct ccctccgatc cgaagacact gccgtttatt attgtgccag aaactatgta 360
 30 ggatctattt tcgattactg gggacaagga acacttctca ccgtaagctc agccagcaca 420
 aagggcccat cggctttccc cctggcacc cctccaaga gcacctctgg gggcacagcg 480
 gccctgggct gcctgggcaa ggactacttc cccgaaccgg tgacgggtgc gtggaactca 540

ggcgccctga ccagcggcgt gcacaccttc ccggctgtcc tacagtcctc aggactctac 600
 tccctcagca gcgtggtgac cgtgccctcc agcagcttgg gcacccagac ctacatctgc 660
 aacgtgaatc acaagcccag caacaccaag gtggacaaga gagttgagcc caaatcttgt 720
 gacaaaactc acacatgtcc accgtgcca gcacctgaac tcctgggggg accgtcagtc 780
 5 ttcctcttcc ccccaaaacc caaggacacc ctcatgatct cccggacccc tgaggtcaca 840
 tgcgtggtgg tggacgtgag ccacgaagac cctgaggtca agttcaactg gtacgtggac 900
 ggcgtggagg tgcataatgc caagacaaag ccgctggagg agcagtacaa cagcacgtac 960
 cgtgtggtca gcgtcctcac cgtcctgcac caggactggc tgaatggcaa ggagtacaag 1020
 tgcaaggtct ccaacaaagc cctcccagcc cccatcgaga aaaccatctc caaagccaaa 1080
 10 gggcagcccc gagaaccaca ggtgtacacc ctgcccccat cccgggagga gatgaccaag 1140
 aaccaggtca gcctgacctg cctggtcaaa ggcttctatc ccagcgacat cgccgtggag 1200
 tgggagagca atgggcagcc ggagaacaac tacaagacca cgctcccgt gctggactcc 1260
 gacggctcct tcttctcta tagcaagctc accgtggaca agagcaggtg gcagcagggg 1320
 aacgtcttct catgctccgt gatgcatgag gctctgcaca accactacac gcagaagagc 1380
 15 ctctccctgt ccccggttaa atga 1404
 <210> 191
 <211> 448
 <212> PRT
 <213> Sequência Artificial
 20 <220>
 <223> Protein Sequence Defining synthetic Full Length Heavy Chain
 Humanized LRMR2B8HC Heavy Chain Variable Region and Human IgG1 Heavy
 Chain Constant Region (G1m(3) allotype) (allele 1) (without signal
 sequence)
 25 <400> 191
 Gln Val Gln Leu Val Gln Pro Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Thr
 1 5 10 15
 Ser Val Lys Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Thr Tyr
 20 25 30
 30 Trp Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
 35 40 45
 Gly Glu Ile Asn Pro Thr Asn Gly His Thr Asn Tyr Asn Gln Lys Phe

gcaaggacag cacctacagc ctcagcagca ccctgacgct gagcaaagca gactacgaga 240
 aacacaaagt ctacgcctgc gaagtcaccc atcagggcct gagctcgccc gtcacaaaga 300
 gcttcaacag gggagagtgt tag 323
 <210> 195
 5 <211> 107
 <212> PRT
 <213> Sequência Artificial
 <220>
 <223> Protein Sequence Encoding synthetic Human Kappa Chain Constant
 10 Region (Km(3) allotype) (allele 1)
 <400> 195
 Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu
 1 5 10 15
 Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe
 15 20 25 30
 Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln
 35 40 45
 Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser
 50 55 60
 20 Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu
 65 70 75 80
 Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser
 85 90 95
 Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 25 100 105
 <210> 196
 <211> 705
 <212> DNA
 <213> Sequência Artificial
 30 <220>
 <223> Nucleic Acid Sequence Encoding synthetic Full Length Humanized
 LR2B8LC Light Chain Variable Region and the Human Kappa Chain Constant

Region (Km(3) allotype) (allele 1)

<400> 196
 atggaaagtc agacccttgt attcatctct attcttcttt ggttgatgg agcagacggc 60
 gacattgtga tgaccaatc cccgatagt atggccatga gtgtaggaga aagagtcacc 120
 5 ctttaattgca aagcctccga aaatgtcggt tcatatgtgt cttggtatca acaaaaaccc 180
 ggccaatcac ccaaacttct catatacggc gttcaaaca gaaacacagg cgttccccgac 240
 agatttagtg gatccggatc agctacagat ttcaccctta ccatcagttc agttcaagca 300
 gaagacgttg cagactatca ttgaggaca tcttataact acccttacac attcggacaa 360
 ggaaccaaac tcgaaattaa acgtacgggt gctgcaccat ctgtcttcat cttcccccca 420
 10 tctgatgagc agttgaaatc tggaactgcc tctgtgtgt gcctgctgaa taacttctat 480
 cccagagagg ccaaagtaca gtggaagggt gataacgccc tccaatcggg taactcccag 540
 gagagtgtca cagagcagga cagcaaggac agcacctaca gcctcagcag caccctgacg 600
 ctgagcaaag cagactacga gaaacacaaa gtctacgcct gcgaagtcac ccatcagggc 660
 ctgagctcgc ccgtcacaaa gagcttcaac aggggagagt gttag 705

15 <210> 197
 <211> 214
 <212> PRT
 <213> Seqüência Artificial
 <220>

20 <223> Protein Sequence Encoding synthetic Full Length Humanized
 LR2B8LC Light Chain Variable Region and the Human Kappa Chain
 Constant Region (Km(3) allotype) (allele 1)

<400> 197
 Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Asp Ser Met Ala Met Ser Val Gly
 25 1 5 10 15
 Glu Arg Val Thr Leu Asn Cys Lys Ala Ser Glu Asn Val Val Ser Tyr
 20 25 30
 Val Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45
 30 Tyr Gly Ala Ser Asn Arg Asn Thr Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 Ser Gly Ser Ala Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Val Gln Ala

gaagacgttg cagactatca ttgtggacaa tcttataact atccttatac tttcggacaa 360
ggcactaaac ttgaaattaa ac 382

<210> 199
<211> 107

5 <212> PRT
<213> Sequência Artificial
<220>
<223> Protein Sequence Defining synthetic Humanized LRMR2B8LC Light
Chain variable Region (without signal sequence)

10 <400> 199
Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu Ala Met Ser Leu Gly
1 5 10 15
Glu Arg Val Thr Leu Asn Cys Lys Ala Ser Glu Asn Val Val Ser Tyr
20 25 30
15 Val Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45
Tyr Gly Ala Ser Asn Arg Glu Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly
50 55 60
Ser Gly Ser Ala Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Val Gln Ala
20 65 70 75 80
Glu Asp Val Ala Asp Tyr His Cys Gly Gln Ser Tyr Asn Tyr Pro Tyr
85 90 95
Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105

25 <210> 200
<211> 705
<212> DNA
<213> Sequência Artificial
<220>

30 <223> Nucleic Acid Sequence Encoding synthetic Full Length Humanized
LRMR2B8LC Light Chain variable Region and the Human Kappa Chain Constant
Region (Km(3) allotype) (allele 1)

<400> 200

atggaatccc aaacccttgt tttcatctct atccttctct ggctttatgg cgccgacgga 60
gacatcgtaa tgacacaatc ccctgactct cttgctatga gcttgggcga acgagtaaca 120
cttaactgca aagcatccga aaatgtcgta tcttacgtat cctgggatca gcaaaaaacct 180
5 ggtcaaagtc ctaaacttct tatatatggt gcaagtaatc gtgaaagtgg cgccccagac 240
agatttagcg gttcaggttc agcaactgac tttacactta caatttctag cgttcaggcc 300
gaagacgttg cagactatca ttgtggacaa tcttataact atccttatac tttcggacaa 360
ggcactaaac ttgaaattaa acgtacggtg gctgcacat ctgtcttcat cttcccgcc 420
tctgatgagc agttgaaatc tggaactgcc tctgttgtgt gcctgctgaa taacttctat 480
10 cccagagagg ccaagtaca gtggaaggtg gataacgccc tccaatcggg taactcccag 540
gagagtgtca cagagcagga cagcaaggac agcacctaca gcctcagcag caccctgacg 600
ctgagcaaag cagactacga gaaacacaaa gtctacgcct gcgaagtcac ccatcagggc 660
ctgagctcgc ccgtcacaaa gagcttcaac aggggagagt gttag 705

<210> 201

15 <211> 214

<212> PRT

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> Protein Sequence Defining synthetic Full Length Humanized

20 LRMR2B8LC Light Chain variable Region and the Human Kappa Chain
Constant Region (Km(3) allotype) (allele 1)

<400> 201

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

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

Val Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Gly Ala Ser Asn Arg Glu Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly
30 50 55 60

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

<212> PRT
 <213> Sequência Artificial
 <220>
 <223> Heavy Chain CDR2 sequence (Kabat Definition) of synthetic
 5 humanized Hu2B8 Hv5a.1 antibody
 <400> 203
 Glu Ile Asn Pro Thr Asn Gly His Thr Asn Tyr Asn Pro Ser Phe Gln
 1 5 10 15
 Gly
 10 <210> 204
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Sequência Artificial
 <220>
 15 <223> Heavy Chain CDR2 sequence (Kabat Definition) of synthetic
 humanized LR2B8HC antibody
 <400> 204
 Glu Ile Asn Pro Thr Asn Gly His Thr Asn Tyr Asn Glu Lys Phe Lys
 1 5 10 15
 20 Gly
 <210> 205
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Sequência Artificial
 25 <220>
 <223> Heavy Chain CDR2 sequence (Kabat Definition) of synthetic
 humanized LRMR2B8HC antibody
 <400> 205
 Glu Ile Asn Pro Thr Asn Gly His Thr Asn Tyr Asn Gln Lys Phe Gln
 30 1 5 10 15
 Gly
 <210> 206

<211> 7
 <212> PRT
 <213> Sequência Artificial
 <220>
 5 <223> Light Chain CDR2 sequence (Kabat Definition) of synthetic
 humanized LRMR2B8LC antibody
 <400> 206
 Gly Ala Ser Asn Arg Glu Ser
 1 5
 10 <210> 207
 <211> 992
 <212> DNA
 <213> Sequência Artificial
 <220>
 15 <223> Nucleic Acid Sequence Encoding synthetic Human IgG1 Heavy Chain
 Constant Region (G1m(3) allotype) (allele 2)
 <400> 207
 cctccaccaa gggcccatcg gtcttcccc tggcacccctc ctccaagagc acctctgggg 60
 gcacagcggc cctgggctgc ctggtcaagg actacttccc cgaaccggtg acgggtgctgt 120
 20 ggaactcagg cgccctgacc agcggcgtgc acaccttccc ggctgtccta cagtcctcag 180
 gactctactc cctcagcagc gtggtgaccg tgccctccag cagcttgggc acccagacct 240
 acatctgcaa cgtgaatcac aagcccagca acaccaaggt ggacaagaga gttgagccca 300
 aatcttgtga caaaactcac acatgcccac cgtgcccagc acctgaactc ctggggggac 360
 cgtcagtctt cctcttcccc caaaaccca aggacaccct catgatctcc cggaccctgt 420
 25 aggtcacatg cgtggtggtg gacgtgagcc acgaagacc tgaggtcaag ttcaactggt 480
 acgtggacgg cgtggagggtg cataatgcca agacaaagcc gcgggaggag cagtacaaca 540
 gcacgtaccg tgtggtcagc gtcctcaccg tcttgacca ggactggctg aatggcaagg 600
 agtacaagtg caaggtctcc aacaaagccc tcccagcccc catcgagaag accatctcca 660
 aagccaaagg gcagccccga gaaccacagg tgtacaccct gccccatcc cgggaggaga 720
 30 tgaccaagaa ccaggtcagc ctgacctgcc tgggtcaaagg cttctatccc agcgacatcg 780
 ccgtggagtg ggagagcaat gggcagccgg agaacaacta caagaccacg cctcccgtgc 840
 tggactccga cggctccttc ttcctctaca gcaagctcac cgtggacaag agcaggtggc 900

agcaggggaa cgtcttctca tgctccgtga tgcattgaggc tctgcacaac cactacacgc 960

agaagagcct ctcctgtct cccgggtaaat ga 992

<210> 208

<211> 330

5 <212> PRT

<213> Seqüência Artificial

<220>

<223> Protein Sequence Defining synthetic Human IgG1 Heavy Chain Constant Region (G1m(3) allotype) (allele 1 or 2)

10 <400> 208

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys

1 5 10 15

Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr

20 25 30

15 Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser

35 40 45

Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser

50 55 60

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr

20 65 70 75 80

Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys

85 90 95

Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys

100 105 110

25 Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro

115 120 125

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

130 135 140

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

30 145 150 155 160

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

165 170 175

gggaaaaggcc tggagtggat gggggagatt aatcctacca acggtcatac taactacaat 240
 ccgtccttcc aaggccaggt caccatctca gctgacaagt ccatcagcac tgcctacctg 300
 cagtggagca gcctgaaggc ctcggacacc gccatgtatt actgtgagag aactatggt 360
 ggtagcatct ttgactactg gggccaagga accctgggtca ccgtctctc agcctccacc 420
 5 aagggcccat cgggtcttccc cctggcacc tctccaaga gcacctctgg gggcacagcg 480
 gccctgggct gcctgggtcaa ggactacttc cccgaaccgg tgacgggtgc gtggaactca 540
 ggcgccttga ccagcggcgt gcacaccttc ccggctgtcc tacagtctc aggactctac 600
 tccctcagca gcgtggtgac cgtgccctcc agcagcttgg gcacccagac ctacatctgc 660
 aacgtgaatc acaagcccag caacaccaag gtggacaaga gagttgagcc caaatcttgt 720
 10 gacaaaactc acacatgcc accgtgcca gcacctgaac tcctgggggg accgtcagtc 780
 ttcctcttcc cccaaaacc caaggacacc ctcatgatct cccggacccc tgaggtcaca 840
 tgcgtggtgg tggacgtgag ccacgaagac cctgaggtca agttcaactg gtacgtggac 900
 ggcgtggagg tgcataatgc caagacaaag ccgctgggagg agcagtacaa cagcacgtac 960
 cggtggttca gcgtcctcac cgtcctgcac caggactggc tgaatggcaa ggagtacaag 1020
 15 tgcaaggtct ccaacaaagc cctcccagcc cccatcgaga agaccatctc caaagccaaa 1080
 gggcagcccc gagaaccaca ggtgtacacc ctgccccat cccgggagga gatgaccaag 1140
 aaccaggtca gcctgacctg cctgggtcaaa ggcttctatc ccagcgacat cgccgtggag 1200
 tgggagagca atgggcagcc ggagaacaac tacaagacca cgctcccgt gctggactcc 1260
 gacggctctc tcttctcta cagcaagctc accgtggaca agagcaggtg gcagcagggg 1320
 20 aacgtcttct catgctccgt gatgcatgag gctctgcaca accactacac gcagaagagc 1380
 ctctccctgt ctccgggtaa atga 1404
 <210> 210
 <211> 448
 <212> PRT
 25 <213> Seqüência Artificial
 <220>
 <223> Protein Sequence Defining synthetic Full Length Heavy Chain Contain-
 ing Humanized Hu2B8 Hv5-51.1 and the Human IgG1 Heavy Chain Constant Regi-
 on G1m(3) allotype (allele 2) (without signal sequence)
 30 <400> 210
 Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Glu

Ser Leu Lys Ile Ser Cys Lys Gly Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Thr Tyr
 20 25 30
 Trp Met His Trp Val Arg Gln Met Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Met
 35 40 45
 5 Gly Glu Ile Asn Pro Thr Asn Gly His Thr Asn Tyr Asn Pro Ser Phe
 50 55 60
 Gln Gly Gln Val Thr Ile Ser Ala Asp Lys Ser Ile Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Trp Ser Ser Leu Lys Ala Ser Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys
 10 85 90 95
 Ala Arg Asn Tyr Val Gly Ser Ile 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
 15 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
 20 165 170 175
 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
 25 Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg 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
 30 245 250 255
 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
 5 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
 10 340 345 350
 Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys
 355 360 365
 Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser
 370 375 380
 15 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
 20 420 425 430
 Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 435 440 445
 <210> 211
 <211> 2209
 25 <212> DNA
 <213> seqüência Artificial
 <220>
 <223> Synthetic HGF mhm (V495-L585)
 <400> 211
 30 atgatgtggg ggaccaaact tctgccggtc ctgttgctgc agcatgtcct cctgcacctc 60
 ctcctgcttc atgtcgccat ccctatgca gaaggacaga agaaaagaag aaatacactt 120
 catgaattta aaaagtcagc aaaactact cttaccaagg aagaccatt actgaagatt 180

	aaaacaaaa aagtgaactc tgcagatgag tgtgccaaca ggtgtatcag gaacaggggc	240
	tttacgttca cttgcaaggc cttcgttttt gataagtcaa gaaaacgatg ctactggtat	300
	cctttcaata gtatgtcaag tggagtgaaa aaagggtttg gccatgaatt tgacctctat	360
	gaaaacaaag actatattag aaactgcatc attggtaaag gaggcagcta taaagggacg	420
5	gtatccatca ctaagagtgg catcaaatgc cagccttggga attccatgat ccccatgaa	480
	cacagctttt tgccttcgag ctatcgcggt aaagacctac aggaaaacta ctgtcgaaat	540
	cctcgagggg aagaaggggg accctggtgt ttcacaagca atccagaggt acgctacgaa	600
	gtctgtgaca ttcctcagtg ttcagaagtt gaatgcatga cctgcaatgg tgaaagctac	660
	agagggtccc tggatcacac agaatcaggc aagacttgtc agcgctggga ccagcagaca	720
10	ccacaccggc acaagttctt gccagaaaga tatcccgaca agggctttga tgataattat	780
	tgccgcaatc ctgatggcaa gccgaggcca tgggtctaca ctcttgacct tgacaccact	840
	tgggagtatt gtgcaattaa aacgtgcgct cacagtgtg tgaatgagac tgatgtccct	900
	atggaaacaa ctgaatgcat tcaaggccaa ggagaagggt acaggggaac cagcaatacc	960
	at ttggaatg gaattccctg tcagcgttgg gattcgcagt accctcaca gcatgatatc	1020
15	actcccgaga acttcaaag caaggacctt agagaaaatt attgccgcaa tccagatggg	1080
	gctgaatcac catggtgttt taccactgac ccaaactcc gagttggcta ctgctctcag	1140
	attcccaagt gtgacgtgtc aagtggacaa gattgttatc gtggcaatgg gaaaaattac	1200
	atgggcaact tatccaaaac aaggctctgga cttacatggt ccatgtggga caagaatatg	1260
	gaggatttac accgtcatat cttctgggag ccagatgcta gcaaattgaa taagaattac	1320
20	tgccggaatc ctgatgatga tgcccatgga ccttgggtgct acacggggaa tcctcttatt	1380
	ccttgggatt attgccctat ttcccgttgt gaaggagata ctacacctac aattgtcaat	1440
	ttggaccatc ctgtaatatc ctgtgcaaaa acaaaacaac tgcgggttgt aaatgggatt	1500
	ccaacacgaa caaacatagg atggatgggt agtttgagat acagaaataa acatatctgc	1560
	ggaggatcat tgataaagga gagttgggtt cttactgcac gacagtgtt cccttctcga	1620
25	gacttgaaag attatgaagc ttggcttggga attcatgatg tccacggaag aggagatgag	1680
	aaatgcaaac aggttctcaa tgtttccag ctggtatatg gccctgaagg atcagatctg	1740
	gttttaatga agcttgctcg acctgcaatc ctggataact ttgtcagtac aattgattta	1800
	cctagttatg gttgtacaat ccctgaaaag accacttgca gtatttacgg ctggggctac	1860
	actggattga tcaacgcgga tggtttatta cgagtagctc atctgtatat tatggggaat	1920
30	gagaaatgca gtcagcacca tcaaggcaag gtgactttga atgagtctga gttatgtgct	1980
	ggggctgaaa agattggatc aggaccatgt gagggagatt atggtggccc actcatttgt	2040
	gaacaacaca aaatgagaat ggttcttgggt gtcattgttc ctggtcgtgg atgtgcatc	2100

ccaaatcgtc ctgttatttt tgttcgagta gcatattatg caaaatggat acacaaagta 2160
 attttgacat acaagttgtg cggccgccat caccatcacc atcactaag 2209
 <210> 212
 <211> 680
 5 <212> PRT
 <213> Sequência Artificial
 <220>
 <223> Synthetic HGF mhm495-585 active
 <400> 212
 10 Pro Leu Leu Lys Ile Lys Thr Lys Lys Val Asn Ser Ala Asp Glu Cys
 1 5 10 15
 Ala Asn Arg Cys Ile Arg Asn Arg Gly Phe Thr Phe Thr Cys Lys Ala
 20 25 30
 Phe Val Phe Asp Lys Ser Arg Lys Arg Cys Tyr Trp Tyr Pro Phe Asn
 15 35 40 45
 Ser Met Ser Ser Gly Val Lys Lys Gly Phe Gly His Glu Phe Asp Leu
 50 55 60
 Tyr Glu Asn Lys Asp Tyr Ile Arg Asn Cys Ile Ile Gly Lys Gly Gly
 65 70 75 80
 20 Ser Tyr Lys Gly Thr Val Ser Ile Thr Lys Ser Gly Ile Lys Cys Gln
 85 90 95
 Pro Trp Asn Ser Met Ile Pro His Glu His Ser Phe Leu Pro Ser Ser
 100 105 110
 Tyr Arg Gly Lys Asp Leu Gln Glu Asn Tyr Cys Arg Asn Pro Arg Gly
 115 120 125
 25 Glu Glu Gly Gly Pro Trp Cys Phe Thr Ser Asn Pro Glu Val Arg Tyr
 130 135 140
 Glu Val Cys Asp Ile Pro Gln Cys Ser Glu Val Glu Cys Met Thr Cys
 145 150 155 160
 30 Asn Gly Glu Ser Tyr Arg Gly Pro Met Asp His Thr Glu Ser Gly Lys
 165 170 175
 Thr Cys Gln Arg Trp Asp Gln Gln Thr Pro His Arg His Lys Phe Leu

	180	185	190
	Pro Glu Arg Tyr Pro Asp Lys Gly Phe Asp Asp Asn Tyr Cys Arg Asn		
	195	200	205
	Pro Asp Gly Lys Pro Arg Pro Trp Cys Tyr Thr Leu Asp Pro Asp Thr		
5	210	215	220
	Thr Trp Glu Tyr Cys Ala Ile Lys Thr Cys Ala His Ser Ala Val Asn		
	225	230	235
	Glu Thr Asp Val Pro Met Glu Thr Thr Glu Cys Ile Gln Gly Gln Gly		
	245	250	255
10	Glu Gly Tyr Arg Gly Thr Ser Asn Thr Ile Trp Asn Gly Ile Pro Cys		
	260	265	270
	Gln Arg Trp Asp Ser Gln Tyr Pro His Lys His Asp Ile Thr Pro Glu		
	275	280	285
	Asn Phe Lys Cys Lys Asp Leu Arg Glu Asn Tyr Cys Arg Asn Pro Asp		
15	290	295	300
	Gly Ala Glu Ser Pro Trp Cys Phe Thr Thr Asp Pro Asn Ile Arg Val		
	305	310	315
	Gly Tyr Cys Ser Gln Ile Pro Lys Cys Asp Val Ser Ser Gly Gln Asp		
	325	330	335
20	Cys Tyr Arg Gly Asn Gly Lys Asn Tyr Met Gly Asn Leu Ser Lys Thr		
	340	345	350
	Arg Ser Gly Leu Thr Cys Ser Met Trp Asp Lys Asn Met Glu Asp Leu		
	355	360	365
	His Arg His Ile Phe Trp Glu Pro Asp Ala Ser Lys Leu Asn Lys Asn		
25	370	375	380
	Tyr Cys Arg Asn Pro Asp Asp Asp Ala His Gly Pro Trp Cys Tyr Thr		
	385	390	395
	Gly Asn Pro Leu Ile Pro Trp Asp Tyr Cys Pro Ile Ser Arg Cys Glu		
	405	410	415
30	Gly Asp Thr Thr Pro Thr Ile Val Asn Leu Asp His Pro Val Ile Ser		
	420	425	430
	Cys Ala Lys Thr Lys Gln Leu Arg Val Val Asn Gly Ile Pro Thr Arg		

<211> 2194

<212> DNA

<213> Sequência Artificial

<220>

5 <223> Synthetic HGF mhm (I499-R556)

<400> 213

	atgatgtggg ggaccaaact tctgccggtc ctgttgctgc agcatgtcct cctgcacctc	60
	ctcctgcttc atgtcgccat cccctatgca gaaggacaga agaaaagaag aaatacactt	120
	catgaattta aaaagtcagc aaaaactact cttaccaagg aagaccatt actgaagatt	180
10	aaaacaaaa aagtgaactc tgcagatgag tgtgccaaca ggtgtatcag gaacaggggc	240
	tttacgttca cttgcaaggc cttcgttttt gataagtcaa gaaaacgatg ctactggtat	300
	cctttcaata gtatgtcaag tggagtgaaa aaagggtttg gccatgaatt tgacctctat	360
	gaaaacaaag actatattag aaactgcatc attggtaaag gaggcagcta taaagggacg	420
	gtatccatca ctaagagtgg catcaaatgc cagccttggga attccatgat ccccatgaa	480
15	cacagctatc gcggtaaaga cctacaggaa aactactgtc gaaatcctcg aggggaagaa	540
	gggggaccct ggtgtttcac aagcaatcca gaggtacgct acgaagtctg tgacattcct	600
	cagtgttcag aagttgaatg catgacctgc aatggtgaaa gctacagagg tcccatggat	660
	cacacagaat caggcaagac ttgtcagcgc tgggaccagc agacaccaca ccggcacaag	720
	ttcttgccag aaagatatcc cgacaagggc tttgatgata attattgccg caatcctgat	780
20	ggcaagccga ggccatggtg ctacactctt gaccctgaca ccccttggga gtattgtgca	840
	atataaacgt gcgctcacag tgctgtgaat gagactgatg tccctatgga aacaactgaa	900
	tgatttcaag gccaaggaga aggttacagg ggaaccagca ataccatttg gaatggaatt	960
	ccctgtcagc gttgggattc gcagtaccct cacaagcatg atatcactcc cgagaacttc	1020
	aaatgcaagg accttagaga aaattattgc cgcaatccag atggggctga atcaccatgg	1080
25	tgttttacca ctgacccaaa catccgagtt ggctactgct ctcagattcc caagtgtgac	1140
	gtgtcaagtg gacaagattg ttatcgtggc aatgggaaaa attacatggg caacttatcc	1200
	aaaacaaggt ctggacttac atgttccatg tgggacaaga atatggagga tttacaccgt	1260
	catatcttct gggagccaga tgctagcaaa ttgaataaga attactgccg gaatcctgat	1320
	gatgatgcc atggaccttg gtgctacacg gggaatcctc ttattccttg ggattattgc	1380
30	cctatttccc gttgtgaagg agatactaca cctacaattg tcaatttggga ccatcctgta	1440
	atatcctgtg ccaaaacaaa acaactgagg gttgtaaatt ggattccaac acgaacaaac	1500
	ataggatgga tggttagttt gagatacaga aataaacata tctgaggagg atcattgata	1560

aaggagagtt gggttcttac tgcacgacag tgtttccctt ctcgagactt gaaagattat 1620
gaagcttggc ttggaattca tgatgtccac ggaagaggag aggagaaaag aaaacagatt 1680
ctcaatattt cccagctggt atatggccct gaaggatcag atctgggtttt actgaagctt 1740
gctcgacctg caatcctgga taactttgtc agtacaattg atttacctag ttatggttgt 1800
5 acaatccctg aaaagaccac ttgcagtatt tacggctggg gctacactgg attgatcaac 1860
gcggatgggt tattacgagt agctcatctg tatattatgg ggaatgagaa atgcagtcag 1920
caccatcaag gcaaggtgac tttgaatgag tctgagttat gtgctggggc tgaaaagatt 1980
ggatcaggac catgtgaggg agattatggt ggcccactca tttgtgaaca acacaaaatg 2040
agaatggttc ttggtgtcat tgttcctggt cgtggatgtg ccatcccaaa tcgtcctggt 2100
10 atttttgttc gagtagcata ttatgcaaaa tggatacaca aagtaatttt gacatacaag 2160
ttgtgcggcc gccatcacca tcaccatcac taag 2194
<210> 214
<211> 675
<212> PRT
15 <213> Sequência Artificial
<220>
<223> Synthetic HGF mhm 499-556 active
<400> 214
Pro Leu Leu Lys Ile Lys Thr Lys Lys Val Asn Ser Ala Asp Glu Cys
20 1 5 10 15
Ala Asn Arg Cys Ile Arg Asn Arg Gly Phe Thr Phe Thr Cys Lys Ala
20 25 30
Phe Val Phe Asp Lys Ser Arg Lys Arg Cys Tyr Trp Tyr Pro Phe Asn
35 40 45
25 Ser Met Ser Ser Gly Val Lys Lys Gly Phe Gly His Glu Phe Asp Leu
50 55 60
Tyr Glu Asn Lys Asp Tyr Ile Arg Asn Cys Ile Ile Gly Lys Gly Gly
65 70 75 80
Ser Tyr Lys Gly Thr Val Ser Ile Thr Lys Ser Gly Ile Lys Cys Gln
30 85 90 95
Pro Trp Asn Ser Met Ile Pro His Glu His Ser Tyr Arg Gly Lys Asp
100 105 110

Leu Gln Glu Asn Tyr Cys Arg Asn Pro Arg Gly Glu Glu Gly Gly Pro
 115 120 125
 Trp Cys Phe Thr Ser Asn Pro Glu Val Arg Tyr Glu Val Cys Asp Ile
 130 135 140
 5 Pro Gln Cys Ser Glu Val Glu Cys Met Thr Cys Asn Gly Glu Ser Tyr
 145 150 155 160
 Arg Gly Pro Met Asp His Thr Glu Ser Gly Lys Thr Cys Gln Arg Trp
 165 170 175
 Asp Gln Gln Thr Pro His Arg His Lys Phe Leu Pro Glu Arg Tyr Pro
 10 180 185 190
 Asp Lys Gly Phe Asp Asp Asn Tyr Cys Arg Asn Pro Asp Gly Lys Pro
 195 200 205
 Arg Pro Trp Cys Tyr Thr Leu Asp Pro Asp Thr Pro Trp Glu Tyr Cys
 210 215 220
 15 Ala Ile Lys Thr Cys Ala His Ser Ala Val Asn Glu Thr Asp Val Pro
 225 230 235 240
 Met Glu Thr Thr Glu Cys Ile Gln Gly Gln Gly Glu Gly Tyr Arg Gly
 245 250 255
 Thr Ser Asn Thr Ile Trp Asn Gly Ile Pro Cys Gln Arg Trp Asp Ser
 20 260 265 270
 Gln Tyr Pro His Lys His Asp Ile Thr Pro Glu Asn Phe Lys Cys Lys
 275 280 285
 Asp Leu Arg Glu Asn Tyr Cys Arg Asn Pro Asp Gly Ala Glu Ser Pro
 290 295 300
 25 Trp Cys Phe Thr Thr Asp Pro Asn Ile Arg Val Gly Tyr Cys Ser Gln
 305 310 315 320
 Ile Pro Lys Cys Asp Val Ser Ser Gly Gln Asp Cys Tyr Arg Gly Asn
 325 330 335
 Gly Lys Asn Tyr Met Gly Asn Leu Ser Lys Thr Arg Ser Gly Leu Thr
 30 340 345 350
 Cys Ser Met Trp Asp Lys Asn Met Glu Asp Leu His Arg His Ile Phe
 355 360 365

Trp Glu Pro Asp Ala Ser Lys Leu Asn Lys Asn Tyr Cys Arg Asn Pro
 370 375 380
 Asp Asp Asp Ala His Gly Pro Trp Cys Tyr Thr Gly Asn Pro Leu Ile
 385 390 395 400
 5 Pro Trp Asp Tyr Cys Pro Ile Ser Arg Cys Glu Gly Asp Thr Thr Pro
 405 410 415
 Thr Ile Val Asn Leu Asp His Pro Val Ile Ser Cys Ala Lys Thr Lys
 420 425 430
 Gln Leu Arg Val Val Asn Gly Ile Pro Thr Arg Thr Asn Ile Gly Trp
 10 435 440 445
 Met Val Ser Leu Arg Tyr Arg Asn Lys His Ile Cys Gly Gly Ser Leu
 450 455 460
 Ile Lys Glu Ser Trp Val Leu Thr Ala Arg Gln Cys Phe Pro Ser Arg
 465 470 475 480
 15 Asp Leu Lys Asp Tyr Glu Ala Trp Leu Gly Ile His Asp Val His Gly
 485 490 495
 Arg Gly Glu Glu Lys Arg Lys Gln Ile Leu Asn Ile Ser Gln Leu Val
 500 505 510
 Tyr Gly Pro Glu Gly Ser Asp Leu Val Leu Leu Lys Leu Ala Arg Pro
 20 515 520 525
 Ala Ile Leu Asp Asn Phe Val Ser Thr Ile Asp Leu Pro Ser Tyr Gly
 530 535 540
 Cys Thr Ile Pro Glu Lys Thr Thr Cys Ser Ile Tyr Gly Trp Gly Tyr
 545 550 555 560
 25 Thr Gly Leu Ile Asn Ala Asp Gly Leu Leu Arg Val Ala His Leu Tyr
 565 570 575
 Ile Met Gly Asn Glu Lys Cys Ser Gln His His Gln Gly Lys Val Thr
 580 585 590
 Leu Asn Glu Ser Glu Leu Cys Ala Gly Ala Glu Lys Ile Gly Ser Gly
 30 595 600 605
 Pro Cys Glu Gly Asp Tyr Gly Gly Pro Leu Ile Cys Glu Gln His Lys
 610 615 620

aaatgcaagg accttagaga aaattattgc cgcaatccag atggggctga atcaccatgg 1080
 tgttttacca ctgacccaaa catccgagtt ggctactgct ctcagattcc caagtgtgac 1140
 gtgtcaagtg gacaagattg ttatcgtggc aatgggaaaa attacatggg caacttatcc 1200
 aaaacaaggt ctggacttac atgttccatg tgggacaaga atatggagga tttacaccgt 1260
 5 catatcttct gggagccaga tgctagcaaa ttgaataaga attactgccg gaatcctgat 1320
 gatgatgccc atggaccttg gtgctacacg gggaatcctc ttattccttg ggattattgc 1380
 cctatttccc gttgtgaagg agatactaca cctacaattg tcaatttggg ccatcctgta 1440
 atatcctgtg ccaaaacaaa acaactgagg gttgtaaatg ggattccaac acaaacacaa 1500
 gtaggatgga tggtagttt gagatacaga aataaacata tctgaggagg atcattgata 1560
 10 aaggagagtt gggttcttac tgcacgacag tgtttccctt ctcgagactt gaaagattat 1620
 gaagcttggc ttggaattca tgatgtccac ggaagaggag atgagaaatg caaacaggtt 1680
 ctcaatgttt cccagctggt atatggccct gaaggatcag atctggtttt aatgaagctt 1740
 gctcgacctg caatcctgga taactttgtc agtacaattg atttacctag ttatggttgt 1800
 acaatccctg aaaagaccac ttgcagtatt tacggctggg gctacactgg attgatcaac 1860
 15 gcggatggtt tattacgagt agctcatctg tatattatgg ggaatgagaa atgcagtcag 1920
 caccatcaag gcaaggtgac tttgaatgag tctgagttat gtgctggggc tgaaaagatt 1980
 ggatcaggac catgtgaggg agattatggt ggcccactca tttgtgaaca acacaaaatg 2040
 agaatggttc ttggtgtcat tgttcctggt cgtggatgtg ccatcccaa tcgtcctggt 2100
 atttttgttc gagtagcata ttatgcaaaa tggatacaca aagtaatttt gacatacaag 2160
 20 ttgtgaggcc gccatcacca tcaccatcac taag 2194
 <210> 216
 <211> 675
 <212> PRT
 <213> Sequência Artificial
 25 <220>
 <223> Synthetic HGF mhm507-585 active
 <400> 216
 Pro Leu Leu Lys Ile Lys Thr Lys Lys Val Asn Ser Ala Asp Glu Cys
 1 5 10 15
 30 Ala Asn Arg Cys Ile Arg Asn Arg Gly Phe Thr Phe Thr Cys Lys Ala
 20 25 30
 Phe Val Phe Asp Lys Ser Arg Lys Arg Cys Tyr Trp Tyr Pro Phe Asn

REIVINDICAÇÕES

1. Proteína de ligação isolada que se liga ao fator de crescimento de hepatócito humano (HGF), a proteína de ligação compreendendo:

5 (a) uma região variável da cadeia leve de imunoglobulina que compreende a estrutura CDR_{L1}-CDR_{L2}-CDR_{L3}, em que

(i) CDR_{L1} compreende a seqüência de aminoácidos X₁ X₂ Ser X₄ X₅ X₆ X₇ X₈ X₉ X₁₀ X₁₁ X₁₂ X₁₃ X₁₄ X₁₅, em que o aminoácido X₁ é Arg, Lys, ou Ser, X₂ é Ala ou Thr, X₄ é Glu, Gln, ou Ser, X₅ é Asn, Asp, ou Ser, X₆ é Ile ou Val, X₇ é Asp, Lys, Ser, Val, ou Tyr, X₈ é uma ligação peptídica ou Tyr, X₉ é uma
10 ligação peptídica ou Asp, X₁₀ é uma ligação peptídica ou Gly, X₁₁ é uma ligação peptídica ou Asn, X₁₂ é uma ligação peptídica, Ile, ou Ser, X₁₃ é Asn ou Tyr, X₁₄ é Ile, Leu, Met, ou Val, X₁₅ é Ala, Asn, His, ou Ser,

(ii) CDR_{L2} compreende a seqüência de aminoácidos X₁₆ X₁₇ X₁₈ X₁₉ X₂₀ X₂₁ X₂₂, em que o aminoácido X₁₆ é Ala, Asp, Arg, Gly, ou Val, X₁₇ é Ala, Thr, ou Val, X₁₈ é Asn, Ser, ou Thr, X₁₉ é Arg, Asn, Lys, ou He, X₂₀ é Leu ou
15 Arg, X₂₁ é Ala, Asn, Glu, Val, ou Pro, X₂₂ é Asp, Ser, ou Thr.

(iii) CDR_{L3} compreende a seqüência de aminoácidos X₂₃ X₂₄ X₂₅ X₂₆ X₂₇ X₂₈ Pro X₃₀ Thr, em que o aminoácido X₂₃ é Leu, Gly, ou Gln, X₂₄ é His ou Gln, X₂₅ é Phe, Ser, Trp, ou Tyr, X₂₆ é Asp, Ile, Ser, Trp, ou Tyr, X₂₇ é Gly,
20 Glu, Asn, ou Ser, X₂₈ é Asp, Asn, Phe, Thr, ou Tyr, X₃₀ é Leu, Phe, Pro, ou Tyr.

(b) uma região variável da cadeia pesada de imunoglobulina que compreende três regiões de determinação de complementaridade, em que as regiões de determinação de complementaridade da cadeia leve de imunoglobulina e da cadeia pesada de imunoglobulina definem um sítio de ligação que se liga a HGF humano.
25

2. Proteína de ligação isolada que se liga ao fator de crescimento de hepatócito humano (HGF), a proteína de ligação compreendendo:

(a) uma região variável da cadeia pesada de imunoglobulina que
30 compreende a estrutura CDR_{H1}-CDR_{H2}-CDR_{H3} em que

(i) CDR_{H1} compreende a seqüência de aminoácidos X₁ Tyr X₃ X₄ X₅ em que o aminoácido X₁ é Asp, Asn, Ser, ou Thr, X₃ é Phe, Ser, Trp, ou

Tyr, X₄ é Ile, Leu, ou Met, X₅ é Asn, His, ou Ser,

(ii) CDR_{H2} compreende a seqüência de aminoácidos X₆ Ile X₈ X₉ X₁₀ X₁₁ Gly X₁₃ X₁₄ X₁₅ Tyr X₁₇ X₁₈ X₁₉ X₂₀ X₂₁ X₂₂, em que o aminoácido X₆ é Lys, Gln, Glu, Val, ou Tyr, X₈ é Asn, Gly, Ser, Trp, ou Tyr, X₉ é Ala, Pro ou Ser, X₁₀ é Gly ou Thr, X₁₁ é uma ligação peptídica, Asp, Asn, Gly, ou Ser, X₁₃ é Asp, Asn, His, ou Ser, X₁₄ é Ser ou Thr, X₁₅ é Asn ou Tyr, X₁₇ é Asn ou Pro, X₁₈ é Ala, Asp, Gly, Gln, Glu, Pro, ou Ser, X₁₉ é Asn, Lys, Met, ou Ser, X₂₀ é Leu, Phe ou Val, X₂₁ is Lys, Met, ou Gln, X₂₂ is Asp, Gly ou Ser

(iii) CDR_{H3} compreende a seqüência de aminoácidos X₂₃ X₂₄ X₂₅ X₂₆ X₂₇ X₂₈ X₂₉ X₃₀ X₃₁ X₃₂ X₃₃ X₃₄ Tyr, em que o aminoácido X₂₃ é Arg, Asn, Gln, ou Glu, X₂₄ é Gly, Leu, Arg, ou Tyr, X₂₅ é uma ligação peptídica, Asp, ou Gly, X₂₆ é uma ligação peptídica ou Gly, X₂₇ é uma ligação peptídica ou Tyr, X₂₈ é uma ligação peptídica, Leu, ou Tyr, X₂₉ é uma ligação peptídica, Gly, Leu, Arg, ou Val, X₃₀ é uma ligação peptídica, Asp, Gly, ou Glu, X₃₁ é uma ligação peptídica, Asn, Arg, Ser, ou Tyr, X₃₂ é uma ligação peptídica, Ala, Gly, Ile, ou Tyr, X₃₃ is Met ou Phe, X₃₄ é Ala ou Asp; e

(b) uma região variável da cadeia leve de imunoglobulina que compreende três regiões de determinação de complementaridade,

em que as regiões de determinação de complementaridade da cadeia leve de imunoglobulina e da cadeia pesada de imunoglobulina definem um sítio de ligação que se liga a HGF humano.

3. Anticorpo isolado da reivindicação 2, em que a região variável da cadeia leve de imunoglobulina compreende a estrutura CDR_{L1}-CDR_{L2}-CDR_{L3}, em que

(i) CDR_{L1} compreende a seqüência de aminoácidos X₁ X₂ Ser X₄ X₅ X₆ X₇ X₈ X₉ X₁₀ X₁₁ X₁₂ X₁₃ X₁₄ X₁₅, em que o aminoácido X₁ é Arg, Lys, ou Ser, X₂ é Ala ou Thr, X₄ é Glu, Gln, ou Ser, X₅ é Asn, Asp, ou Ser, X₆ é Ile ou Val, X₇ é Asp, Lys, Ser, Val, ou Tyr, X₈ é uma ligação peptídica ou Tyr, X₉ é uma ligação peptídica ou Asp, X₁₀ é uma ligação peptídica ou Gly, X₁₁ é uma ligação peptídica ou Asn, X₁₂ é uma ligação peptídica, Ile, ou Ser, X₁₃ é Asn ou Tyr, X₁₄ é Ile, Leu, Met, ou Val, X₁₅ é Ala, Asn, His, ou Ser,

(ii) CDR_{L2} compreende a seqüência de aminoácidos X₁₆ X₁₇ X₁₈

X_{19} X_{20} X_{21} X_{22} , em que o aminoácido X_{16} é Ala, Asp, Arg, Gly, ou Val, X_{17} é Ala, Thr, ou Val, X_{18} é Asn, Ser, ou Thr, X_{19} é Arg, Asn, Lys, ou He, X_{20} é Leu ou Arg, X_{21} é Ala, Asn, Glu, Val, ou Pro, X_{22} é Asp, Ser, ou Thr, e

(iii) CDR_{L3} compreende a seqüência de aminoácidos X_{23} X_{24} X_{25}
 5 X_{26} X_{27} X_{28} Pro X_{30} Thr, em que o aminoácido X_{23} é Leu, Gly, ou Gln, X_{24} é His ou Gln, X_{25} é Phe, Ser, Trp, ou Tyr, X_{26} é Asp, Ile, Ser, Trp, ou Tyr, X_{27} é Gly, Glu, Asn, ou Ser, X_{28} é Asp, Asn, Phe, Thr, ou Tyr, X_{30} é Leu, Phe, Pro, ou Tyr.

4. Proteína de ligação da reivindicação 1, 2 ou 3 em que as regi-
 10 ões de determinação de complementaridade estão interpostas entre regiões de arcabouço.

5. Proteína de ligação da reivindicação 4 em que as seqüências de CDR estão interpostas entre regiões de arcabouço humanas ou humanizadas.

15 6. Ácido nucléico isolado que compreende uma seqüência de nucleotídeos que codifica a região variável da cadeia leve de imunoglobulina da reivindicação 1.

7. Vetor de expressão que contém uma seqüência de nucleotídeos da reivindicação 6.

20 8. Célula hospedeira que contem o vetor de expressão da reivindicação 7.

9. Método para produzir uma proteína de ligação, o método compreendendo:

(a) cultivar a célula hospedeira da reivindicação 8 sob condições
 25 tais que a célula hospedeira expresse a região variável da cadeia leve de imunoglobulina; e

(b) coletar a região variável da cadeia leve de imunoglobulina.

10. Método da reivindicação 9, em que, após a etapa (b), a região variável da cadeia leve de imunoglobulina é ligada covalentemente a uma
 30 região variável da cadeia pesada de imunoglobulina, tal que as regiões variáveis da cadeia leve e da cadeia pesada juntas se liguem a HGF humano.

11. Ácido nucléico isolado que compreende uma seqüência de

nucleotídeos que codifica a região variável da cadeia pesada de imunoglobulina da reivindicação 2.

12. Vetor de expressão que contém uma seqüência de nucleotídeos da reivindicação 11.

5 13. Célula hospedeira que contém o vetor de expressão da reivindicação 12.

14. Método para produzir uma proteína de ligação, o método compreendendo:

10 (a) cultivar as células hospedeiras da reivindicação 13 sob condições tais que a célula hospedeira expresse a região variável da cadeia pesada de imunoglobulina; e

(b) coletar a região variável da cadeia pesada de imunoglobulina.

15 15. Método da reivindicação 14, em que, após a etapa (b), a região variável da cadeia pesada de imunoglobulina é ligada covalentemente a uma região variável da cadeia leve de imunoglobulina, tal que as regiões variáveis da cadeia leve e da cadeia pesada juntas se liguem a HGF humano.

20 16. Proteína de ligação isolada que se liga ao fator de crescimento de hepatócito humano (HGF) compreendendo:

(a) uma região variável da cadeia leve de imunoglobulina que compreende a estrutura CDR_{L1} - CDR_{L2} - CDR_{L3} , em que

25 (i) CDR_{L1} compreende uma seqüência selecionada do grupo que consiste em SEQ ID N°: 8 (**1A3**), SEQ ID N°: 18 (**2B8**), SEQ ID N°: 28 (**2F8**), SEQ ID N°: 38 (**3B6**), SEQ ID N°: 48 (**3D11**), SEQ ID N°: 58 (**1D3**), SEQ ID N°: 68 (**1F3**), e SEQ ID N°: 78 (**3A12**).

30 (ii) CDR_{L2} compreende uma seqüência selecionada do grupo que consiste em SEQ ID N°: 9 (**1A3**), SEQ ID N°: 19 (**2B8**), SEQ ID N°: 29 (**2F8**), SEQ ID N°: 39 (**3B6**), SEQ ID N°: 49 (**3D11**), SEQ ID N°: 59 (**1D3**), SEQ ID N°: 69 (**1F3**), SEQ ID N°: 79 (**3A12**); e

(iii) CDR_{L3} compreende uma seqüência selecionada do grupo que consiste em SEQ ID N°: 10 (**1A3**), SEQ ID N°: 20 (**2B8**), SEQ ID N°: 30

(2F8), SEQ ID Nº: 40 (3B6), SEQ ID Nº: 50 (3D11), SEQ ID Nº: 60 (1D3), SEQ ID Nº: 70 (1F3), e SEQ ID Nº: 80 (3A12); e

5 (b) uma região variável da cadeia pesada de imunoglobulina, em que a região variável da cadeia leve de imunoglobulina e a região variável da cadeia pesada de imunoglobulina juntas definem um único sítio de ligação para ligação de HGF humano.

17. A proteína de ligação da reivindicação 16, em que a região variável da cadeia leve de imunoglobulina compreende

10 (i) uma CDR_{L1} que compreende a seqüência SEQ ID Nº: 8 (1A3),

(ii) uma CDR_{L2} que compreende a seqüência SEQ ID Nº: 9 (1A3), e

(iii) uma CDR_{L3} que compreende a seqüência SEQ ID Nº: 10 (1A3).

15 18. A proteína de ligação da reivindicação 16, em que a região variável da cadeia leve de imunoglobulina compreende

(i) uma CDR_{L1} que compreende a seqüência SEQ ID Nº: 18 (2B8),

20 (ii) uma CDR_{L2} que compreende a seqüência SEQ ID Nº: 19 (2B8), e

(iii) uma CDR_{L3} que compreende a seqüência SEQ ID Nº: 20 (2B8).

19. A proteína de ligação da reivindicação 16, em que a região variável da cadeia leve de imunoglobulina compreende

25 (iv) uma CDR_{L1} que compreende a seqüência SEQ ID Nº: 28 (2F8),

(v) uma CDR_{L2} que compreende a seqüência SEQ ID Nº: 29 (2F8), e

30 (vi) uma CDR_{L3} que compreende a seqüência SEQ ID Nº: 30 (2F8).

20. Proteína de ligação da reivindicação 16, em que a região variável da cadeia leve de imunoglobulina compreende

(i) uma CDR_{L1} que compreende a seqüência SEQ ID Nº: 38
(3B6),

(ii) uma CDR_{L2} que compreende a seqüência SEQ ID Nº: 39
(3B6), e

5 (iii) uma CDR_{L3} que compreende a seqüência SEQ ID Nº: 40
(3B6).

21. Proteína de ligação da reivindicação 16, em que a região variável da cadeia leve de imunoglobulina compreende

(i) uma CDR_{L1} que compreende a seqüência SEQ ID Nº: 48
10 **(3D11)**,

(ii) uma CDR_{L2} que compreende a seqüência SEQ ID Nº: 49
(3D11), e

(iii) uma CDR_{L3} que compreende a seqüência SEQ ID Nº: 50
(3D11).

15 22. Proteína de ligação da reivindicação 16, em que a região variável da cadeia leve de imunoglobulina compreende

(i) uma CDR_{L1} que compreende a seqüência SEQ ID Nº: 58
(1D3),

(ii) uma CDR_{L2} que compreende a seqüência SEQ ID Nº: 59
20 **(1D3)**, e

(iii) uma CDR_{L3} que compreende a seqüência SEQ ID Nº: 60
(1D3).

23. Proteína de ligação da reivindicação 16, em que a região variável da cadeia leve de imunoglobulina compreende

(i) uma CDR_{L1} que compreende a seqüência SEQ ID Nº: 68
25 **(1F3)**,

(ii) uma CDR_{L2} que compreende a seqüência SEQ ID Nº: 69
(1F3), e

(iii) uma CDR_{L3} que compreende a seqüência SEQ ID Nº: 70
30 **(1F3)**.

24. Proteína de ligação da reivindicação 16, em que a região variável da cadeia leve de imunoglobulina compreende

(i) uma CDR_{L1} que compreende a seqüência SEQ ID Nº: 78
(3A12),

(ii) uma CDR_{L2} que compreende a seqüência SEQ ID Nº: 79
(3A12), e

5 (iii) uma CDR_{L3} que compreende a seqüência SEQ ID Nº: 80
(3A12).

25. Proteína de ligação da reivindicação 16, em que CDR_{L1}, CDR_{L2} e CDR_{L3} estão interpostas entre regiões de arcabouço de imunoglobulina humana ou humanizada.

10 26. Proteína de ligação da reivindicação 16, em que a proteína de ligação é um anticorpo ou um fragmento de ligação ao antígeno deste.

27. Proteína de ligação da reivindicação 26, em que o anticorpo é um anticorpo monoclonal.

15 28. Proteína de ligação isolada que se liga ao fator de crescimento de hepatócito humano (HGF) compreendendo:

(a) uma região variável da cadeia pesada de imunoglobulina que compreende a estrutura CDR_{H1}-CDR_{H2}-CDR_{H3} em que

(i) CDR_{H1} compreende uma seqüência selecionada do grupo que consiste em SEQ ID Nº: 5 **(1A3)**, SEQ ID Nº: 15 **(2B8)**, SEQ ID Nº: 25 **(2F8)**,
20 SEQ ID Nº: 35 **(3B6)**, SEQ ID Nº: 45 **(3D11)**, SEQ ID Nº: 55 **(1D3)**, SEQ ID Nº: 65 **(1F3)**, e SEQ ID Nº: 75 **(3A12)**;

(ii) CDR_{H2} compreende uma seqüência selecionada do grupo que consiste em SEQ ID Nº: 6 **(1A3)**, SEQ ID Nº: 16 **(2B8)**, SEQ ID Nº: 26 **(2F8)**,
25 SEQ ID Nº: 36 **(3B6)**, SEQ ID Nº: 46 **(3D11)**, SEQ ID Nº: 56 **(1D3)**, SEQ ID Nº: 66 **(1F3)**, SEQ ID Nº: 76 **(3A12)**, SEQ ID Nº: 202 **(Hu2B8 Hv1f.1)**, e SEQ ID Nº: 203 **(Hu2B8 Hv5a.1 e Hu2B8 Hv5-51.1)**, e

(iii) CDR_{H3} compreende uma seqüência selecionada do grupo que consiste em SEQ ID Nº: 7 **(1A3)**, SEQ ID Nº: 17 **(2B8)**, SEQ ID Nº: 27 **(2F8)**,
30 SEQ ID Nº: 37 **(3B6)**, SEQ ID Nº: 47 **(3D11)**, SEQ ID Nº: 57 **(1D3)**, SEQ ID Nº: 67 **(1F3)**, e SEQ ID Nº: 77 **(3A12)**; e

(b) uma região variável da cadeia leve de imunoglobulina, em que a região variável da cadeia pesada de imunoglobulina e a região variável-

vel da cadeia leve de imunoglobulina juntas definem um sítio de ligação único para ligação de HGF humano.

29. Proteína de ligação da reivindicação 28, em que a região variável da cadeia pesada de imunoglobulina compreende

5 (i) uma CDR_{H1} que compreende a seqüência SEQ ID Nº: 5
(1A3),

(ii) uma CDR_{H2} que compreende a seqüência SEQ ID Nº: 6
(1A3), e

10 (iii) uma CDR_{H3} que compreende a seqüência SEQ ID Nº: 7
(1A3).

30. Proteína de ligação da reivindicação 28, em que a região variável da cadeia pesada de imunoglobulina compreende

(i) uma CDR_{H1} que compreende a seqüência SEQ ID Nº: 15
(2B8),

15 (ii) uma CDR_{H2} que compreende a seqüência SEQ ID Nº: 16
(2B8), SEQ ID Nº: 202 (Hu2B8 Hv1f.1), SEQ ID Nº: 203 (Hu2B8 Hv5a.1 or Hu2B8 Hv5-51.1) e

(iii) uma CDR_{H3} que compreende a seqüência SEQ ID Nº: 17
(2B8).

20 31. Proteína de ligação da reivindicação 28, em que a região variável da cadeia pesada de imunoglobulina compreende

(i) uma CDR_{H1} que compreende a seqüência SEQ ID Nº: 25
(2F8),

25 (ii) uma CDR_{H2} que compreende a seqüência SEQ ID Nº: 26
(2F8), e

(iii) uma CDR_{H3} que compreende a seqüência SEQ ID Nº: 27
(2F8).

32. Proteína de ligação da reivindicação 28, em que a região variável da cadeia pesada de imunoglobulina compreende

30 (i) uma CDR_{H1} que compreende a seqüência SEQ ID Nº: 35
(3B6),

(ii) uma CDR_{H2} que compreende a seqüência SEQ ID Nº: 36

(3B6), e

(iii) uma CDR_{H3} que compreende a seqüência SEQ ID Nº: 37

(3B6).

5 33. Proteína de ligação da reivindicação 28, em que a região variável da cadeia pesada de imunoglobulina compreende

(i) uma CDR_{H1} que compreende a seqüência SEQ ID Nº: 45

(3D11),

(ii) uma CDR_{H2} que compreende a seqüência SEQ ID Nº: 46

(3D11), e

10 (iii) uma CDR_{H3} que compreende a seqüência SEQ ID Nº: 47

(3D11).

34. Proteína de ligação da reivindicação 28, em que a região variável da cadeia pesada de imunoglobulina compreende

(i) uma CDR_{H1} que compreende a seqüência SEQ ID Nº: 55

15 **(1D3)**,

(ii) uma CDR_{H2} que compreende a seqüência SEQ ID Nº: 56

(1D3), e

(iii) uma CDR_{H3} que compreende a seqüência SEQ ID Nº: 57

(1D3).

20 35. Proteína de ligação da reivindicação 28, em que a região variável da cadeia pesada de imunoglobulina compreende

(i) uma CDR_{H1} que compreende a seqüência SEQ ID Nº: 65

(1F3),

(ii) uma CDR_{H2} que compreende a seqüência SEQ ID Nº: 66

25 **(1F3)**, e

(iii) uma CDR_{H3} que compreende a seqüência SEQ ID Nº: 67

(1F3).

36. Proteína de ligação da reivindicação 28, em que a região variável da cadeia pesada de imunoglobulina compreende

30 (i) uma CDR_{H1} que compreende a seqüência SEQ ID Nº: 75

(3A12),

(ii) uma CDR_{H2} que compreende a seqüência SEQ ID Nº: 76

(3A12), e

(iii) uma CDR_{H3} que compreende a seqüência SEQ ID Nº: 77

(3A12).

5 37. Proteína de ligação da reivindicação 28, em que CDR_{H1}, CDR_{H2} e CDR_{H3} estão interpostas entre regiões de arcabouço de imunoglobulina humana ou humanizada.

38. Proteína de ligação da reivindicação 28, em que a proteína de ligação é um anticorpo ou um fragmento de ligação ao antígeno desse.

10 39. Arcabouço de ligação da reivindicação 38, em que o anticorpo é um anticorpo monoclonal.

40. Ácido nucléico isolado que compreende uma seqüência de nucleotídeos que codifica a região variável da cadeia leve de imunoglobulina da reivindicação 16.

15 41. Vetor de expressão que contem o ácido nucléico da reivindicação 40.

42. Célula hospedeira que contém o vetor de expressão da reivindicação 41.

43. Método para produzir uma proteína de ligação, o método compreendendo:

20 (a) cultivar a célula hospedeira da reivindicação 42 sob condições tais que a célula hospedeira expresse a região variável da cadeia leve de imunoglobulina; e

(b) coletar a região variável da cadeia leve de imunoglobulina.

25 44. Método da reivindicação 43, em que, após a etapa (b), a região variável da cadeia leve de imunoglobulina é ligada covalentemente a uma região variável da cadeia pesada de imunoglobulina, tal que as regiões variáveis da cadeia leve e da cadeia pesada juntas se liguem a HGF humano.

30 45. Ácido nucléico isolado que compreende uma seqüência de nucleotídeos que codifica a região variável da cadeia pesada de imunoglobulina da reivindicação 28.

46. Vetor de expressão que contem a seqüência de ácido nu-

cléico da reivindicação 45.

47. Célula hospedeira que contem o vetor de expressão da reivindicação 46.

5 48. Método de produzir uma proteína de ligação, o método compreendendo:

(a) cultivar a célula hospedeira da reivindicação 47 sob condições tais que a célula hospedeira expresse a região variável da cadeia pesada de imunoglobulina; e

10 (b) coletar a região variável da cadeia pesada de imunoglobulina.

49. Método da reivindicação 48, em que, após a etapa (b), a região variável da cadeia pesada de imunoglobulina é ligada covalentemente a uma região variável da cadeia leve de imunoglobulina, tal que as regiões variáveis da cadeia leve e da cadeia pesada juntas se liguem a HGF humano.

15 50. Proteína de ligação isolada que se liga ao fator de crescimento de hepatócito humano (HGF) compreendendo:

uma região variável da cadeia leve de imunoglobulina selecionada do grupo que consiste nos resíduos 21-127 de SEQ ID Nº: 4 (**1A3**), resíduos 21-127 de SEQ ID Nº: 14 (**2B8**), resíduos 20-131 de SEQ ID Nº: 24 (**2F8**), resíduos 23-129 de SEQ ID Nº: 34 (**3B6**), resíduos 23-128 de SEQ ID Nº: 44 (**3D11**), resíduos 21-127 de SEQ ID Nº: 54 (**1D3**), e resíduos 21-127 de SEQ ID Nº: 64 (**1F3**), resíduos 21-127 de SEQ ID Nº: 74 (**3A12**), SEQ ID Nº: 173 (**região variável da cadeia Kappa de Hu2B8 Kv1-39.1**), SEQ ID Nº: 179 (**região variável de cadeia Kappa Hu2B8 Kv3-15.1**), e

25 uma região variável da cadeia pesada de imunoglobulina selecionada do grupo que consiste nos resíduos 20-141 de SEQ ID Nº: 2 (**1A3**), resíduos 20-137 de SEQ ID Nº: 12 (**2B8**), resíduos 20-137 de SEQ ID Nº: 22 (**2F8**), resíduos 20-139 de SEQ ID Nº: 32 (**3B6**), resíduos 20-132 de SEQ ID Nº: 42 (**3D11**), resíduos 20-141 de SEQ ID Nº: 52 (**1D3**), resíduos 20-141 de SEQ ID Nº: 62 (**1F3**), e resíduos 20-141 de SEQ ID Nº: 72 (**3A12**), SEQ ID Nº: 159 (**região variável de cadeia pesada de Hu2B8 Hv1f.1**), SEQ ID Nº:

165 (região variável de cadeia pesada de Hu2B8 Hv5a.1), e SEQ ID N°: 169 (região variável da cadeia pesada de Hu2B8 Hv5-51.1).

51. Proteína de ligação da reivindicação 50, em que a região variável da cadeia leve de imunoglobulina compreende a seqüência de aminoácidos dos resíduos 21-127 de SEQ ID N°: 4 (**1A3**) e a região variável da cadeia pesada de imunoglobulina compreende a seqüência de aminoácidos dos resíduos 20-141 de SEQ ID N°: 2 (**1A3**).

52. Proteína de ligação da reivindicação 50, em que a região variável da cadeia leve de imunoglobulina compreende a seqüência de aminoácidos dos resíduos 21-127 de SEQ ID N°: 14 (**2B8**) e a região variável da cadeia pesada de imunoglobulina compreende a seqüência de aminoácidos dos resíduos 20-137 de SEQ ID N°: 12 (**2B8**).

53. Proteína de ligação da reivindicação 50, em que a região variável da cadeia leve de imunoglobulina compreende a seqüência de aminoácidos dos resíduos 20-131 de SEQ ID N°: 24 (**2F8**) e a região variável da cadeia pesada de imunoglobulina compreende a seqüência de aminoácidos dos resíduos 20-137 de SEQ ID N°: 22 (**2F8**).

54. Proteína de ligação da reivindicação 50, em que a região variável da cadeia leve de imunoglobulina compreende a seqüência de aminoácidos dos resíduos 23-129 de SEQ ID N°: 34 (**3B6**) e a região variável da cadeia pesada de imunoglobulina compreende a seqüência de aminoácidos dos resíduos 20-139 de SEQ ID N°: 32 (**3B6**).

55. Proteína de ligação da reivindicação 50, em que a região variável da cadeia leve de imunoglobulina compreende a seqüência de aminoácidos dos resíduos 23-128 de SEQ ID N°: 44 (**3D11**) e a região variável da cadeia pesada de imunoglobulina compreende a seqüência de aminoácidos dos resíduos 20-132 de SEQ ID N°: 42 (**3D11**).

56. Proteína de ligação da reivindicação 50, em que a região variável da cadeia leve de imunoglobulina compreende a seqüência de aminoácidos dos resíduos 21-127 de SEQ ID N°: 54 (**1D3**) e a região variável da cadeia pesada de imunoglobulina compreende a seqüência de aminoácidos dos resíduos 20-141 de SEQ ID N°: 12 (**1D3**).

57. Proteína de ligação da reivindicação 50, em que a região variável da cadeia leve de imunoglobulina compreende a seqüência de aminoácidos dos resíduos 21-127 de SEQ ID N°: 64 **(1F3)** e a região variável da cadeia pesada de imunoglobulina compreende a seqüência de aminoácidos dos resíduos 20-141 de SEQ ID N°: 62 **(1F3)**.

58. Proteína de ligação da reivindicação 50, em que a região variável da cadeia leve de imunoglobulina compreende a seqüência de aminoácidos dos resíduos 21-127 de SEQ ID N°: 74 **(3A12)** e a região variável da cadeia pesada de imunoglobulina compreende a seqüência de aminoácidos dos resíduos 20-141 de SEQ ID N°: 72 **(3A12)**.

59. Proteína de ligação isolada que se liga ao fator de crescimento de hepatócito humano (HGF) compreendendo:

uma região variável da cadeia leve de imunoglobulina selecionada do grupo que consiste em SEQ ID N°: 173 **(região variável da cadeia leve de Hu2B8 Kv1-39.1)**, SEQ ID N°: 179 **(região variável da cadeia leve de Hu2B8 Kv3-15.1)**; e

uma região variável da cadeia pesada de imunoglobulina selecionada do grupo que consiste em SEQ ID N°: 159 **(região variável de cadeia pesada de Hu2B8 Hv1f.1)**, SEQ ID N°: 165 **(região variável de cadeia pesada de Hu2B8 Hv5a.1)**, SEQ ID N°: 169 **(região variável de cadeia pesada de Hu2B8 Hv5-51.1)**.

60. Proteína de ligação isolada que se liga ao fator de crescimento de hepatócito humano (HGF) compreendendo:

uma região variável da cadeia leve de imunoglobulina selecionada do grupo que consiste em SEQ ID N°: 177 **(Hu2B8 Kv1-39.1 + constante kappa (alótipo Km(3) (alelo 2))**, SEQ ID N°: 181 **(Hu2B8 Kv3-15.1 + constante Kappa (alótipo Km(3) (alelo 2))**; e

uma região variável da cadeia leve de imunoglobulina selecionada do grupo que consiste em SEQ ID N°: 163 **(Hu2B8 Hv1f.1 + Constante de IgG1 (alótipo G1m(17,1)))**, SEQ ID N°: 167 **(Hu2B8 Hv5a.1 + Constante de IgG1 (alótipo G1m(17,1))**, SEQ ID N°: 171 **(Hu2B8 Hv5-51.1 + Constante de IgG1 (alótipo G1m(17,1))** e SEQ ID N°: 210 **(Hu2B8 Hv5-51.1 +**

Constante de IgG1 (alótipo G1m(3) (alelo 2)).

61. Proteína de ligação da reivindicação 50, 59 ou 60, em que a proteína de ligação é um anticorpo ou um fragmento de ligação ao antígeno deste.

5 62. Proteína de ligação da reivindicação 61, em que o anticorpo é um anticorpo monoclonal.

63. Proteína de ligação isolada que se liga ao fator de crescimento de hepatócito humano (HGF), a proteína de ligação compreendendo:

10 (i) uma região variável da cadeia leve de imunoglobulina que compreende três regiões de determinação de complementaridade; e

 (ii) uma região variável da cadeia pesada de imunoglobulina que compreende três regiões de determinação de complementaridade,

 em que as regiões de determinação de complementaridade da cadeia leve de imunoglobulina e da cadeia pesada de imunoglobulina juntas definem um sítio de ligação que se liga a HGF humano reduzido.

64. Proteína de ligação da reivindicação 63, em que a proteína de ligação é um anticorpo ou um fragmento de ligação ao antígeno deste.

65. Proteína de ligação da reivindicação 64, em que o anticorpo é um anticorpo monoclonal.

20 66. Proteína de ligação da reivindicação 63, em que as regiões de determinação de complementaridade estão interpostas entre regiões estruturais.

67. Proteína de ligação da reivindicação 63, em que a cadeia pesada de imunoglobulina é de IgG1.

25 68. Proteína de ligação da reivindicação 63, em que a proteína de ligação se liga a HGF humano contendo uma substituição de cisteína por arginina na posição 561 ou uma substituição de glicina por glutamato na posição 555.

30 69. Proteína de ligação da reivindicação 63, em que a proteína de ligação se liga a cadeia α de HGF humano.

70. Proteína de ligação da reivindicação 63, em que a região variável da cadeia leve de imunoglobulina compreende pelo menos uma re-

gião de determinação de complementaridade (CDR) selecionada do grupo que consiste em CDR_{L1}, CDR_{L2} e CDR_{L3},

em que CDR_{L1} compreende a seqüência de aminoácidos X₁ X₂ Ser X₄ X₅ X₆ X₇ X₈ X₉ X₁₀ X₁₁ X₁₂ X₁₃ X₁₄ X₁₅, em que o aminoácido X₁ é Arg ou Lys, X₂ é Ala ou Thr, X₄ é Glu ou Gln, X₅ é Asn, Ser, ou Asp, X₆ é Ile ou Val, X₇ é Tyr, Asp, ou Lys, X₈ é uma ligação peptídica ou Tyr, X₉ é uma ligação peptídica ou Asp, X₁₀ é uma ligação peptídica ou Gly, X₁₁ é uma ligação peptídica ou Asn, X₁₂ é uma ligação peptídica ou Ser, X₁₃ é Asn ou Tyr, X₁₄ é Ile ou Leu, X₁₅ é Ala, Asn, ou Ser,

em que CDR_{L2} compreende a seqüência de aminoácidos X₁₆ X₁₇ X₁₈ X₁₉ Leu X₂₁ X₂₂, em que o aminoácido X₁₆ é Ala, Asp, Val, ou Arg, X₁₇ é Ala ou Val, X₁₈ é Asn, Ser, ou Thr, X₁₉ é Arg, Asn, ou He, X₂₁ é Ala, Glu, Val, ou Pro, X₂₂ é Asp ou Ser e

em que CDR_{L3} compreende a seqüência de aminoácidos X₂₃ X₂₄ X₂₅ X₂₆ X₂₇ X₂₈ Pro X₃₀ Thr, em que o aminoácido X₂₃ é Leu ou Gln, X₂₄ é His ou Gln, X₂₅ é Phe, Ser, ou Tyr, X₂₆ é Asp, Ile, ou Trp, X₂₇ é Gly ou Glu, X₂₈ é Asp, Phe, ou Thr, X₃₀ é Phe, Pro, ou Tyr.

71. Proteína de ligação da reivindicação 63 ou 70, em que a região variável da cadeia pesada de imunoglobulina que compreende pelo menos uma região de determinação de complementaridade (CDR) selecionada do grupo que consiste em CDR_{H1}, CDR_{H2} e CDR_{H3},

em que CDR_{H1} compreende a seqüência de aminoácidos X₁ Tyr X₃ X₄ X₅, em que o aminoácido X₁ é Asp, Asn, Ser, ou Thr, X₃ é Phe, Trp, ou Tyr, X₄ é Ile ou Met, X₅ é Asn, His, ou Ser.

em que CDR_{H2} compreende a seqüência de aminoácidos X₆ Ile X₈ X₉ Gly X₁₁ Gly X₁₃ X₁₄ X₁₅ Tyr X₁₇ X₁₈ X₁₉ X₂₀ Lys X₂₂, em que o aminoácido X₆ é Lys, Gln, ou Tyr, X₈ é Gly, Ser, ou Tyr, X₉ é Pro ou Ser, X₁₁ é Asp, Gly, ou Ser, X₁₃ é Asp ou Ser, X₁₄ é Ser ou Thr, X₁₅ é Asn ou Tyr, X₁₇ é Asn ou Pro, X₁₈ é Ala, Asp, Gly, ou Glu, X₁₉ é Asn, Met, ou Ser, X₂₀ é Phe ou Val, X₂₂ é Asp ou Gly e

em que CDR_{H3} compreende a seqüência de aminoácidos X₂₃ X₂₄ X₂₅ X₂₆ X₂₇ X₂₈ X₂₉ X₃₀ X₃₁ X₃₂ X₃₃ Asp Tyr, em que o aminoácido X₂₃ é Arg

ou Gln, X₂₄ é Gly ou Leu, X₂₅ é Asp, Gly, ou uma ligação peptídica, X₂₆ é Gly ou uma ligação peptídica, X₂₇ é uma ligação peptídica ou Tyr, X₂₈ é Leu, uma ligação peptídica ou Tyr, X₂₉ é a Gly, Arg ou Leu, X₃₀ é Asp, Gly ou Glu, X₃₁ é a Tyr, Arg ou Asn, X₃₂ é Ala, Gly ou Tyr, X₃₃ é Met ou Phe.

5 72. Proteína de ligação da reivindicação 70, em que a cadeia leve de imunoglobulina compreende

(i) uma CDR_{L1} que tem uma seqüência selecionada do grupo que consiste em SEQ ID N^o: 8 (**1A3**), SEQ ID N^o: 28 (**2F8**), SEQ ID N^o: 38 (**3B6**), SEQ ID N^o: 58 (**1D3**), e SEQ ID N^o: 68 (**1F3**),

10 (ii) uma CDR_{L2} que tem uma seqüência selecionada do grupo que consiste em SEQ ID N^o: 9 (**1A3**), SEQ ID N^o: 29 (**2F8**), SEQ ID N^o: 39 (**3B6**), SEQ ID N^o: 59 (**1D3**), e SEQ ID N^o: 69 (**1F3**), e

(iii) uma CDR_{L3} que tem uma seqüência selecionada do grupo que consiste de SEQ ID N^o: 10 (**1A3**), SEQ ID N^o: 30 (**2F8**), SEQ ID N^o: 40 (**3B6**),
15 SEQ ID N^o: 60 (**1D3**), e SEQ ID N^o: 70 (**1F3**).

73. Proteína de ligação da reivindicação 72, em que as seqüências de CDR estão interpostas entre regiões de arcabouço humanas ou humanizadas.

20 74. Proteína de ligação da reivindicação 72, em que a região variável da cadeia leve de imunoglobulina compreende uma seqüência de aminoácidos selecionada do grupo que consiste nos resíduos 21-127 de SEQ ID N^o: 4 (**1A3**), resíduos 20-131 de SEQ ID N^o: 24 (**2F8**), resíduos 23-129 de SEQ ID N^o: 34 (**3B6**), resíduos 21-127 de SEQ ID N^o: 54 (**1D3**), e resíduos 21-127 de SEQ ID N^o: 64 (**1F3**).

25 75. Proteína de ligação da reivindicação 71, em que a cadeia pesada da imunoglobulina compreende

(i) uma CDR_{H1} que tem uma seqüência selecionada do grupo que consiste em SEQ ID N^o: 5 (**1A3**), SEQ ID N^o: 25 (**2F8**), SEQ ID N^o: 35 (**3B6**), SEQ ID N^o: 55 (**1D3**), e SEQ ID N^o: 65 (**1F3**),

30 (ii) uma CDR_{H2} que tem uma seqüência selecionada do grupo que consiste em SEQ ID N^o: 6 (**1A3**), SEQ ID N^o: 26 (**2F8**), SEQ ID N^o: 36 (**3B6**), SEQ ID N^o: 56 (**1D3**), e SEQ ID N^o: 66 (**1F3**), e

(iii) uma CDR_{H3} que tem uma seqüência selecionada do grupo que consiste em SEQ ID N°: 7 (**1A3**), SEQ ID N°: 27 (**2F8**), SEQ ID N°: 37 (**3B6**), SEQ ID N°: 57 (**1D3**), e SEQ ID N°: 67 (**1F3**).

5 76. Proteína de ligação da reivindicação 75, em que as seqüências de CDR estão interpostas entre regiões de arcabouço humanas ou humanizadas.

10 77. Proteína de ligação da reivindicação 75, em que a região variável da cadeia pesada de imunoglobulina compreende uma seqüência de aminoácidos selecionada do grupo que consiste nos resíduos 20-141 de SEQ ID N°: 2 (**1A3**), resíduos 20-137 de SEQ ID N°: 22 (**2F8**), resíduos 20-139 de SEQ ID N°: 32 (**3B6**), resíduos 20-141 de SEQ ID N°: 52 (**1D3**), e resíduos 20-141 de SEQ ID N°: 62 (**1F3**).

15 78. Ácido nucléico isolado que compreende uma seqüência de nucleotídeos que codifica a região variável da cadeia leve de imunoglobulina da reivindicação 63, 70, 72 ou 74.

79. Vetor de expressão que contém a seqüência de ácido nucléico da reivindicação 78.

80. Célula hospedeira que contém o vetor de expressão da reivindicação 79.

20 81. Ácido nucléico isolado que compreende uma seqüência de nucleotídeos que codifica a região variável da cadeia pesada de imunoglobulina da reivindicação 63, 71, 75 ou 77.

82. Vetor de expressão que contém a seqüência de ácido nucléico da reivindicação 81.

25 83. Célula hospedeira que contém o vetor de expressão da reivindicação 82.

30 84. Proteína de ligação isolada que se liga ao fator de crescimento de hepatócito humano (HGF) que compreende uma região variável da cadeia leve de imunoglobulina e uma região variável da cadeia pesada de imunoglobulina, em que a proteína de ligação isolada compete pela ligação a HGF com pelo menos um anticorpo de referência selecionado do grupo que consiste em

(i) um anticorpo que tem uma região variável da cadeia leve de imunoglobulina dos resíduos 20-131 de SEQ ID Nº: 24 (**2F8**) e uma região variável da cadeia pesada de imunoglobulina dos resíduos 20-137 de SEQ ID Nº: 22 (**2F8**),

5 (ii) um anticorpo que tem uma região variável da cadeia leve de imunoglobulina dos resíduos 23-129 de SEQ ID Nº: 34 (**3B6**), e uma região variável da cadeia pesada de imunoglobulina dos resíduos 20-139 de SEQ ID Nº: 32 (**3B6**) e

10 (iii) um anticorpo que tem uma região variável da cadeia leve de imunoglobulina dos resíduos 23-128 de SEQ ID Nº: 44 (**3D11**) e uma região variável da cadeia pesada de imunoglobulina dos resíduos 20-132 de SEQ ID Nº: 42 (**3D11**).

15 85. Proteína de ligação da reivindicação 84, em que a proteína de ligação se liga ao mesmo epítipo de HGF que um dos anticorpos de referência.

86. Proteína de ligação isolada que se liga ao fator de crescimento de hepatócito humano (HGF) um k_d de $4,0 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$ ou menor.

87. Proteína de ligação da reivindicação 86, em que o k_d é $3,0 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$ ou menor.

20 88. Proteína de ligação da reivindicação 87, em que o k_d é $2,0 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$ ou menor.

89. Proteína de ligação isolada que se liga ao fator de crescimento de hepatócito humano (HGF) humano com K_d de 20 pM ou menor.

25 90. Proteína de ligação da reivindicação 89, em que o K_d é de 10 pM ou menor.

91. Proteína de ligação da reivindicação 90, em que o K_d é de 5 pM ou menor.

30 92. Proteína de ligação isolada que se liga ao fator de crescimento de hepatócito humano (HGF), em que o anticorpo se liga a HGF humano com K_d menor a 37°C do que a 25°C.

93. Proteína de ligação da reivindicação 92, em que a proteína de ligação tem um K_d menor do que 5 pM a 37°C.

94. Método de inibir ou reduzir a proliferação de uma célula tumoral que compreende expor a célula a uma quantidade eficaz da proteína de ligação da reivindicação 1, 2, 3, 16, 28, 50, 59, 60, 63, 70, 71, 72, 74, 75, 77, 84, 86 ou 89 para reduzir ou inibir a proliferação da célula tumoral.

5 95. Método de inibir ou reduzir a proliferação de uma célula tumoral que compreende expor a célula a uma quantidade eficaz da proteína de ligação que inibe ou reduz a proliferação da célula tumoral, em que a proteína de ligação se liga especificamente a HGF humano, mas não reduz substancialmente a habilidade de HGF humano se ligar a c-Met.

10 96. Método da reivindicação 95, em que a proteína de ligação compreende a proteína de ligação da reivindicação 22, 23, 24, 34, 35, 36, 56, 57, 58, 84, 86 ou 89.

97. Método da reivindicação 94 ou 95, em que a célula tumoral é uma célula tumoral humana.

15 98. Método de inibir ou reduzir o crescimento do tumor em um mamífero, o método compreendendo expor o mamífero a uma quantidade eficaz da proteína de ligação da reivindicação 1, 2, 3, 16, 28, 50, 59, 60, 63, 84, 86, 89 ou 92 para inibir ou reduzir a proliferação do tumor.

20 99. Método de tratar um tumor em um mamífero, o método compreendendo administrar uma quantidade eficaz da proteína de ligação da reivindicação 1, 2, 3, 16, 28, 50, 59, 60, 63, 84, 86, 89 ou 92.

100. Método da reivindicação 98 ou 99, em que o mamífero é um humano.

RESUMO

Patente de Invenção: "**PROTEÍNAS DE LIGAÇÃO AO FATOR DE CRESCIMENTO DE HEPATÓCITO (HGF)**".

5 A presente invenção refere-se a uma família de proteínas de ligação que se ligam e neutralizam a atividade do fator de crescimento de hepatócito (HGF), em particular, HGF humano. As proteínas de ligação podem ser usadas como agentes de diagnóstico ou terapêuticos. Com relação a sua atividade terapêutica, as proteínas de ligação podem ser usadas para tratar certas desordens responsivas a HGF, por exemplo, certos tumores respon-

10 sivos a HGF.