

(12) FASCÍCULO DE PATENTE DE INVENÇÃO

(22) Data de pedido: 2005.01.06	(73) Titular(es): NOVARTIS VACCINES AND DIAGNOSTICS INC. 4560 HORTON STREET, EMERYVILLE, CALIFORNIA 94608-2916 US
(30) Prioridade(s): 2004.01.07 US 535181 P 2004.06.02 US 576417 P	
(43) Data de publicação do pedido: 2006.09.27	(72) Inventor(es): DEBORAH LEE ZIMMERMAN US KIRSTON KOTHS US LI LONG US LIU CHENG US GREGORY MARTIN HARROWE US
(45) Data e BPI da concessão: 2015.04.29 173/2015	(74) Mandatário: NUNO MIGUEL OLIVEIRA LOURENÇO RUA CASTILHO, Nº 50 - 9º 1269-163 LISBOA PT

(54) Epígrafe: **ANTICORPO MONOCLONAL ESPECÍFICO DE M-CSF E RESPATIVOS USOS**

(57) Resumo:

ANTICORPOS ESPECÍFICOS PARA M-CSF BASEADOS EM RX1 OU DERIVADOS DE RX1 SÃO FORNECIDOS, JUNTAMENTE COM COMPOSIÇÕES FARMACÊUTICAS CONTENDO TAL ANTICORPO, KITS CONTENDO UMA COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA, E MÉTODOS PARA PREVENIR E TRATAR A PERDA ÓSSEA NUM INDIVÍDUO SOFRENDO DE UMA DOENÇA OSTEOLÍTICA.

RESUMO

"ANTICORPO MONOCLONAL ESPECÍFICO DE M-CSF E RESPETIVOS USOS"

Anticorpos específicos para M-CSF baseados em RX1 ou derivados de RX1 são fornecidos, juntamente com composições farmacêuticas contendo tal anticorpo, kits contendo uma composição farmacêutica, e métodos para prevenir e tratar a perda óssea num indivíduo sofrendo de uma doença osteolítica.

DESCRIÇÃO
"ANTICORPO MONOCLONAL ESPECÍFICO DE M-CSF E RESPETIVOS
USOS"

CAMPO TÉCNICO

Esta invenção refere-se a um anticorpo humanizado M-CSF para prevenir e tratar a osteólise, metástases de cancro e perda óssea associada a metástases de cancro num indivíduo.

ANTECEDENTES DA INVENÇÃO

Metástases de cancro são a principal causa de reincidência pós-operatória ou pós-terapêutica em doentes de cancro. Apesar dos esforços intensivos para desenvolver tratamentos, as metástases de cancro permanecem substancialmente refratárias à terapia. O osso é um dos locais mais comuns de metástases de vários tipos de cancros humanos (e.g., cancros da mama, pulmão, próstata e tiroide). A ocorrência de metástases osteolíticas do osso causa uma grave morbidez devido a dor intratável, elevada suscetibilidade à fratura, compressão de nervos e hipercalemia. Apesar da importância destes problemas clínicos, existem poucos tratamentos disponíveis para a perda óssea associada a metástases de cancro.

Os osteoclastos medeiam a reabsorção óssea. Os osteoclastos são células multinucleadas que se diferenciam a partir das células hematopoiéticas. É geralmente aceite que os osteoclastos são formados pela fusão de precursores mononucleados derivados de células estaminais

hematopoiéticas na medula óssea, em vez de divisões celulares incompletas (Chambers, Bone and Mineral Research, 6: 1-25, 1989; Göthling et al., Clin Orthop Relat R. 120: 201-228, 1976; Kahn et al., Nature 258: 325-327, 1975, Suda et al., Endocr Rev 13: 66-80, 1992; Walker, Science 180: 875, 1973; Walker, Science 190: 785-787, 1975; Walker, Science 190: 784-785, 1975). Partilham uma célula estaminal comum com as células da linhagem monócito-macrófago (Ash et al., Nature 283: 669-670, 1980, Kerby et al., J. Bone Miner Res 7: 353-62, 1992). A diferenciação de precursores de osteoclastos em osteoclastos maduros multinucleados necessita de diferentes fatores incluindo estímulos hormonais e locais (Athanasou et al., Bone Miner 3: 317-333, 1988; Feldman et al., Endocrinology 107: 1137-1143, 1980; Walker, Science 190: 784-785, 1975; Zheng et al., Histochem J 23: 180-188, 1991) e o osso vivo e as células ósseas tem mostrado desempenhar um papel crítico no desenvolvimento dos osteoclastos (Hagenaars et al., Bone Miner 6: 179-189, 1989). Células osteoblásticas ou estromais da medula óssea são também necessárias para a diferenciação dos osteoclastos. Um dos fatores produzidos por estas células que suporta a formação de osteoclastos é o fator estimulador de colónias de macrófagos (*macrophage-colony stimulating factor*, M-CSF) (Wiktor-Jedrzejczak et al., Proc Natl Acad Sci USA 87: 4828-4832, 1990; Yoshida et al., Nature 345: 442-444, 1990). O ativador de recetor para o ligando de NF- κ B (RANKL, também conhecido como TRANCE, ODF e OPGL) é outro sinal (Suda et al., Endocr Rev 13: 66-80, 1992) através do qual as células osteoblásticas/estromais estimulam a formação de osteoclastos e a reabsorção via um recetor, RANK (TRANCER), localizado nos osteoclastos e precursores de osteoclastos (Lacey et al., Cell 93: 165-176, 1998; Tsuda et al., Biochem Biophys Res Co 234: 137-142, 1997; Wong et al., J

Exp Med 186: 2075-2080, 1997; Wong et al., J Biol. Chem 272: 25190-25194, 1997; Yasuda et al., Endocrinology 139: 1329-1337, 1998; Yasuda et al., Proc Natl Acad Sci US 95: 3597-3602, 1998). Os osteoblastos também secretam uma proteína que inibe fortemente a formação de osteoclastos chamada osteoprotegerina (OPG, também conhecida como OCIF), que atua como um recetor atrator para o RANKL inibindo assim o sinal positivo entre osteoclastos e osteoblastos via RANK e RANKL.

Os osteoclastos são responsáveis por dissolver tanto a matriz óssea mineral como a orgânica (Blair et al., J Cell Biol 102: 1164-1172, 1986). Os osteoclastos representam células terminalmente diferenciadas expressando uma morfologia polarizada única com áreas especializadas da membrana e diversos marcadores membranares e citoplasmáticos, tais como fosfatase ácida resistente a tartrato (*tartrate resistant acid phosphatase*, TRAP) (Anderson et al. 1979), anidrase carbónica II (Väänänen et al., Histochemistry 78: 481-485, 1983), recetor de calcitonina (Warshafsky et al., Bone 6: 179-185, 1985) e recetor de vitronectina (Davies et al., J Cell Biol 109: 1817-1826, 1989). Os osteoclastos multinucleados usualmente contêm menos de 10 núcleos, mas podem conter cerca de 100 núcleos de 10 e 100 µm de diâmetro (Göthling et al., Clin Orthop Relat R 120: 201-228, 1976). Isto faz com que seja relativamente fácil identificar-se por microscopia de luz. São altamente vacuolados quando no seu estado ativo, e contêm também muitas mitocôndrias, indicativas de uma elevada taxa metabólica (Mundy, in Primer on the metabolic bone diseases and disorders of mineral metabolism, págs. 18-22, 1990). Uma vez que os osteoclastos desempenham um papel principal nas metástases ósseas osteolíticas, existe necessidade no estado da técnica de novos agentes e métodos para prevenir a estimulação e função dos osteoclastos.

Assim, subsiste uma necessidade no estado da técnica de identificar novos agentes e métodos para prevenir ou tratar a osteólise ou as metástases de cancro, incluindo metástases ósseas osteolíticas.

SUMÁRIO DA INVENÇÃO

Os materiais e métodos da presente invenção preenchem as necessidades supramencionadas e outras relacionadas no estado da técnica. A invenção fornece um anticorpo humanizado anti-M-CSF, em que: a cadeia pesada compreende a sequência da região variável da cadeia pesada estabelecida na SEQ ID NO: 43 uma região constante IgG1; e a cadeia leve compreende a sequência da região variável da cadeia leve estabelecida na SEQ ID NO: 53.

Um anticorpo monoclonal não murino é aqui divulgado, incluindo um fragmento funcional, que se liga especificamente ao mesmo epítipo de M-CSF tal como qualquer um dos anticorpos monoclonais murinos RX1, MC1, ou MC3 contendo as sequências de aminoácidos estabelecidas nas Figuras 4, 14, e 15, respetivamente. Um anticorpo mencionado é divulgado, em que o anticorpo é selecionado do grupo que consiste de um anticorpo policlonal; um anticorpo monoclonal incluindo um anticorpo *Human Engineered*TM; um anticorpo humanizado; um anticorpo humano; um anticorpo quimérico; fragmento de anticorpo Fab, F(ab')₂; Fv; Sc Fv ou SCA; um diacorpo; anticorpo linear; ou uma muteína de qualquer um destes anticorpos, que preferencialmente retêm uma afinidade de ligação de pelo menos 10⁻⁷, 10⁻⁸ ou 10⁻⁹ ou superior. Um anticorpo monoclonal não-murino, incluindo um fragmento funcional, competidor com o anticorpo monoclonal

RX1, MC1, e/ou MC3 contendo a sequência de aminoácidos estabelecida na Figura 4 para ligação ao M-CSF em mais de 75%, é também contemplado.

Um anticorpo monoclonal não murino, incluindo um fragmento funcional, em que o referido anticorpo monoclonal não murino ou fragmento funcional do mesmo se liga a um epítopo de M-CSF que inclui pelo menos 4, 5, 6, 7 ou 8 resíduos de aminoácidos contíguos 98-105 da Figura 12 é divulgado.

Também aqui divulgado é um anticorpo monoclonal não murino, incluindo um fragmento funcional, em que o referido anticorpo monoclonal não murino ou fragmento funcional do mesmo se liga a um epítopo de M-CSF que inclui pelo menos 4, 5, 6, 7 ou 8 resíduos de aminoácidos contínuos 65-73 ou 138-144 da Figura 12 (correspondentes aos epítopos de M-CSF reconhecidos por 5H4 ou MC3).

O anticorpo ou fragmento supramencionado que se liga a um epítopo de M-CSF que inclui os aminoácidos 98-105 da Figura 12 é aqui divulgado. Também aqui divulgado é o anticorpo supramencionado compreendendo CDR3 da Figura 4A. O anticorpo pode compreender pelo menos 1, 2, 3, 4, 5, ou 6 CDRs do anticorpo murino RX1 estabelecidas na Figura 4A. Tal anticorpo que compreende pelo menos 1, 2, 3, 4, ou 5 CDRs do anticorpo murino RX1 pode também compreender pelo menos 1, 2, 3, 4, ou 5 CDRs de qualquer uma das 6 CDRs do anticorpo 5H4 estabelecidas na Figura 16A-B. Alternativamente, o anticorpo que compreende pelo menos 1, 2, 3, 4, ou 5 CDRs do anticorpo murino RX1 pode também compreender pelo menos 1, 2, 3, 4, ou 5 CDRs de qualquer uma das 6 CDRs do anticorpo MC1 estabelecidas na Figura 16A-B. Ainda noutra alternativa, o anticorpo supramencionado pode também compreender pelo menos 1, 2, 3, 4, ou 5 CDRs de qualquer uma das 6 CDRs do anticorpo MC3

estabelecidas na Figura 16A-B. O anticorpo que compreende pelo menos 1, 2, 3, 4, ou 5 CDRs do anticorpo murino RX1 pode compreender pelo menos 1, 2, 3, 4 ou 5 CDRs do conjunto de CDRs consenso estabelecido na Figura 16A-B. No anticorpo supramencionado um ou mais resíduos da(s) CDR(s) consenso podem ser substituídas pelo resíduo correspondente de qualquer uma das CDRs do anticorpo murino RX1, 5H4, MC1 ou MC3. A afinidade de ligação desejada pode ser retida embora um ou mais dos aminoácidos no anticorpo tenham sido mutados, e.g. por substituições conservativas nas CDRs, e/ou modificações conservativas ou não conservativas nos resíduos de risco baixo e moderado.

Também aqui divulgadas são variantes do anticorpo supramencionado, compreendendo uma sequência de aminoácidos de cadeia pesada variável que é pelo menos 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, ou 99% homóloga à sequência de aminoácidos estabelecida nas Figuras 4A, 13, 14, ou 15. O anticorpo pode compreender uma sequência de aminoácidos de cadeia leve variável que é pelo menos 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, ou 99% homóloga à sequência de aminoácidos estabelecida nas Figuras 4A, 13, 14, ou 15.

Um anticorpo pode compreender uma região constante e uma ou mais regiões *framework* variáveis da cadeia pesada e leve de uma sequência de anticorpo humano. O anticorpo pode compreender uma região constante modificada ou não modificada de um IgG1, IgG2, IgG3 ou IgG4 humano. Preferencialmente, a região constante é IgG1 ou IgG4 humano, a qual pode opcionalmente ser modificada para acentuar ou diminuir certas propriedades. No caso de IgG1, modificações na região constante, particularmente na região da dobradiça ou CH2, pode aumentar ou diminuir a função efetora, incluindo a atividade ADCC e/ou CDC. Uma região

constante de IgG2 pode ser modificada para diminuir a formação do agregado anticorpo-antígeno. No caso de IgG4, modificações na região constante, particularmente na região da dobradiça, pode reduzir a formação de meios-anticorpos.

O anticorpo supramencionado pode ser derivado de, baseado em, ou conter partes de uma sequência consenso humana, sequência de linha germinal humana, sequência de linha germinal consenso humana, ou qualquer uma das sequências de anticorpo em Kabat, NCBI Ig Blast, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/igblast/showGermline.cgi>, base de dados Kabat <http://www.bioinf.org.uk/abs/seqtest.html>, sítio FTP para lançamento de Kabat 5.0 (1992) <ftp://ftp.ncbi.nih.gov/repository/kabat/Rel5.0/>, base de dados ImMunoGeneTics (Montpellier France) <http://imgt.cnusc.fr:8104/>, V-Base <http://www.mrccpe.cam.ac.uk/LIST.php?menu=901>, Zurich University <http://www.unizh.ch/~antibody/Sequences/index.html>, The Therapeutic Antibody Human Homology Project (TAHHP) <http://www.path.cam.ac.uk/~mrc7/humanisation/TAHHP.html>, Protein Sequence and Structure Analysis of Antibody Domains <http://how.to/AnalyseAntibodies/>, Humanization by design <http://people.cryst.bbk.ac.uk/~ubcg07s/>, Antibody Resources <http://www.antibodyresource.com/educational.html>, Antibody Engineering (by TT Wu), Humana Press.

Num aspeto preferido da invenção, o anticorpo supramencionado é um anticorpo Human Engineered™. Por exemplo, a sequência do anticorpo Human Engineered™ é qualquer uma das sequências estabelecidas nas Figuras 23-24. Outros anticorpos Human Engineered™ ou variantes dos mesmos são contemplados.

Por exemplo, o anticorpo supramencionado baseado em RX1 é divulgado, em que a região variável da cadeia pesada compreende uma sequência de aminoácidos X₁VX₂LX₃EX₄GX₅X₆X₇X₈X₉X₁₀X₁₁X₁₂X₁₃LX₁₄LX₁₅CX₁₆VX₁₇DYSITSDYAWNWX₁₈QX₁₉X₂₀X₂₁X₂₂X₂₃LX₂₄WMGYISYSGSTSX₂₅NX₂₆X₂₇LX₂₈X₂₉X₃₀IX₃₁IX₃₂RX₃₃X₃₄X₃₅X₃₆X₃₇X₃₈FX₃₉LX₄₀LX₄₁X₄₂VX₄₃X₄₄X₄₅DX₄₆AX₄₇YYCASFDYAHAMDYWX₄₈GTX₄₉VX₅₀VX₅₁X₅₂ (SEQ ID NO: 124), em que X é qualquer aminoácido. O anticorpo é divulgado em que a região variável da cadeia pesada compreende a sequência de aminoácidos DVX₁LX₂EX₃GPX₄X₅VX₆PX₇X₈X₉LX₁₀LX₁₁CX₁₂VTDYSITSDYAWNWX₁₃PX₁₄X₁₅KLEWMGYISYSGSTSYNPSLX₁₆RIX₁₇IX₁₈RX₁₉TX₂₀X₂₁NX₂₂FX₂₃LX₂₄LX₂₅X₂₆VX₂₇X₂₈X₂₉DX₃₀ATYYCASFDYAHAMDYWX₃₁GTX₃₂VX₃₃VX₃₄X₃₅ (SEQ ID NO: 125), em que X é qualquer aminoácido.

Também aqui divulgado é o anticorpo supramencionado, em que a região variável da cadeia pesada compreende a sequência de aminoácidos

X₁VQLQESGPGLVKPSQX₂LSLTCTVX₃DYSITSDYAWNWX₄QFPGX₅LEWMGYISYSGSTSYNPSLKSRIX₆IX₇RDTSKNQFX₈LQLNSVTX₉X₁₀DTAX₁₁YYCASFDYAHAMDYWGQGTX₁₂VTVSS (SEQ ID NO: 126), em que X é qualquer aminoácido. O anticorpo é divulgado, em que a região variável da cadeia pesada compreende a sequência de aminoácidos

DVQLQESGPGLVKPSQX₁LSLTCTVTDYSITSDYAWNWX₂QFPGX₃KLEWMGYISYSGSTSYNPSLKSRIX₄IX₅RDTSKNQFX₆LQLNSVTX₇DTATYYCASFDYAHAMDYWGQGTX₈VTVSS (SEQ ID NO: 127), em que X é qualquer aminoácido. O anticorpo é divulgado em que a região variável da cadeia pesada compreende a sequência de aminoácidos

DVQLQESGPGLVKPSQTLTLTCTVTDYSITSDYAWNWX₂QFPGKLEWMGYISYSGSTSYNPSLKSRTISRDTSKNQFSLQLNSVTAADTATYYCASFDYAHAMDYWGQGTTVTVSS (SEQ ID NO: 41). A cadeia pesada do anticorpo da invenção compreende a sequência de aminoácidos da região variável da cadeia pesada

QVQLQESGPGGLVKPSQTLTLCTVSDYSITSDYAWNWIRQFPGKGLEWMGYISYSGSTS
 YNPSLKSRLTISRDTSKNQFSLQLNSVTAADTAVYYCASFDYAHAMDYWGQGT
 VTVSS (SEQ ID NO: 43).

Também aqui divulgado é o anticorpo supramencionado em que a região variável da cadeia leve compreende a sequência de aminoácidos

X₁IX₂LX₃QX₄X₅X₆X₇X₈X₉VX₁₀X₁₁X₁₂X₁₃X₁₄VX₁₅FX₁₆CX₁₇AX₁₈QSIGTSHWYX₁₉QX₂₀X₂₁X₂₂X₂₃X₂₄PX₂₅LLIKYASEX₂₆X₂₇X₂₈X₂₉IX₃₀X₃₁X₃₂FX₃₃GX₃₄GX₃₅GX₃₆X₃₇FX₃₈LX₃₉IX₄₀X₄₁VX₄₂X₄₃X₄₄DX₄₅ADYYCQQINSWPTTFGX₄₆GTX₄₇LX₄₈X₄₉X₅₀X₅₁X₅₂

(SEQ ID NO: 128), em que X é qualquer aminoácido. O anticorpo é divulgado em que a região variável da cadeia leve compreende a sequência de aminoácidos X₁X₂LX₃QX₄PX₅X₆LX₇VX₈PX₉X₁₀X₁₁VX₁₂FX₁₃CX₁₄ASQSIGTSHWYQQX₁₅TX₁₆X₁₇SPRLLIKYASEX₁₈ISX₁₉IPX₂₀RFX₂₁GX₂₂GX₂₃GX₂₄X₂₅FX₂₆LX₂₇IX₂₈X₂₉VX₃₀X₃₁X₃₂D

X₃₃ADYYCQQINSWPTTFGX₃₄GTX₃₅LX₃₆X₃₇X₃₈X₃₉X₄₀ (SEQ ID NO: 129), em que X é qualquer aminoácido. O anticorpo é divulgado em que a região variável da cadeia leve compreende a sequência de aminoácidos

X₁IX₂LTQSPX₃X₄LSVSPGERVX₅FSCRASQSIGTSHWYQQX₆TX₇X₈X₉PRLLIKYASEX₁₀X₁₁X₁₂GIPX₁₃RFSGSGSGTDFTLX₁₄IX₁₅X₁₆VESEX₁₇ADYYCQQINSWPTTFGX₁₈GTKLEIKRX₁₉ (SEQ ID NO: 130), em que X é qualquer aminoácido.

Também aqui divulgado é o anticorpo supramencionado em que a região variável da cadeia leve compreende a sequência de aminoácidos

X₁IX₂LTQSPX₃X₄LSVSPGERVX₅FSCRASQSIGTSHWYQQX₆TX₇X₈SPRLLIKYASEX₉ISGIPX₁₀RFSGSGSGTDFTLX₁₁IX₁₂X₁₃VESEX₁₄ADYYCQQINSWPTTFGX₁₅GTKLEIKRX₁₆ (SEQ ID NO: 131), em que X é qualquer aminoácido.

O anticorpo é divulgado em que a região variável da cadeia leve compreende a sequência de aminoácidos X₁IX₂LTQSPX₃X₄LSVSPGERVX₅FSCRASQSIGTSHWYQQX₆TX₇X₈X₉PRLLIKYASESISGIPX₁₀RFSGSGSGTDFTLX₁₁X₁₂X₁₃VESEX₁₄ADYYCQQINSWPTTFGX₁₅GTKLE

IK RX₁₆ (SEQ ID NO: 132), em que X é qualquer aminoácido. O anticorpo é divulgado em que a região variável da cadeia leve compreende a sequência de aminoácidos EIVLTQSPGTLVSPGERVTFSCRASQSIGTSHHWYQQKTGQAPRLLIKYASESISGIP DRFSGSGSGTDFTLTISRVESEDFADYYCQQINSWPTTFGQGTKLEIKRT (SEQ ID NO: 45).

Também aqui divulgado é o anticorpo supramencionado em que a região variável da cadeia leve compreende a sequência de aminoácidos

EIVLTQSPGTLVSPGERVTFSCRASQSIGTSHHWYQQKTGQAPRLLIKYASERATGIP DRFSGSGSGTDFTLTISRVESEDFADYYCQQINSWPTTFGQGTKLEIKRT (SEQ ID NO: 47). O anticorpo é divulgado, em que a região variável da cadeia leve compreende a sequência de aminoácidos EIVLTQSPGTLVSPGERVTFSCRASQSIGTSHHWYQQKTGQSPRLLIKYASERISGIP DRFSGSGSGTDFTLTISRVESEDFADYYCQQINSWPTTFGQGTKLEIKRT (SEQ ID NO: 48).

Também aqui divulgado é o anticorpo supramencionado em que pelo menos um X é um aminoácido correspondente dentro de uma sequência de aminoácidos estabelecida na Figura 4A. O anticorpo é divulgado em que pelo menos um X é uma substituição conservativa (de acordo com a Tabela 1) de um aminoácido correspondente dentro de uma sequência de aminoácidos estabelecida na Figura 4A. Também aqui divulgado é o anticorpo em que pelo menos um X é uma substituição não conservativa (de acordo com a Tabela 1) de um aminoácido correspondente dentro de uma sequência de aminoácidos estabelecida na Figura 4A. Também aqui divulgado é o anticorpo em que pelo menos um X é um aminoácido correspondente dentro de uma sequência de anticorpo humana.

O anticorpo Human Engineered™ supracitado é derivado de, baseado em, ou contém partes de uma sequência consenso

humana, sequência de linha germina humana, sequência de linha germinal consenso humana, ou qualquer uma das sequências de anticorpo em Kabat, NCBI Ig Blast, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/igblast/showGermline.cgi>, base de dados Kabat <http://www.bioinf.org.uk/abs/seqtest.html>, sítio FTP para lançamento de Kabat 5.0 (1992) <ftp://ftp.ncbi.nih.gov/repository/kabat/Rel5.0/>, base de dados ImMunoGeneTics (Montpellier France) <http://imgt.cnusc.fr:8104/>, V-Base <http://www.mrccpe.cam.ac.uk/LIST.php?menu=901>, Zurich University <http://www.unizh.ch/~antibody/Sequences/index.html>, The Therapeutic Antibody Human Homology Project (TAHHP) <http://www.path.cam.ac.uk/~mrc7/humanisation/TAHHP.html>, Protein Sequence and Structure Analysis of Antibody Domains <http://how.to/AnalyseAntibodies/>, Humanization by design <http://people.cryst.bbk.ac.uk/~ubcg07s/>, Antibody Resources <http://www.antibodyresource.com/educational.html>, Antibody Engineering (by TT Wu), Humana Press.

Também aqui divulgado é o anticorpo supramencionado em que a sequência do anticorpo Human Engineered™ é uma das sequências estabelecidas nas Figuras 23-24 ou 29-30. O anticorpo pode compreender uma sequência de aminoácidos de cadeia pesada variável que é pelo menos 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, ou 99% idêntica a uma das sequências de aminoácidos de cadeia pesada estabelecidas na Figura 19B. O anticorpo pode compreender uma sequência de aminoácidos de cadeia leve variável que é pelo menos 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, ou 99% idêntico a uma das sequências de aminoácidos de cadeia leve estabelecidas em qualquer uma das Figuras 20B-22B.

O anticorpo supramencionado tal como anticorpo 5H4, MC1 ou MC3 com as sequências estabelecidas nas Figuras 24C-24E podem ser Human Engineered™ de acordo com os métodos estabelecidos em Studnicka et al., Patente U.S. No. 5.766.886 e Exemplo 4A aqui, usando a numeração de Kabat estabelecida nas Figuras 24C-24E para identificar resíduos de risco baixo, moderado e elevado. O anticorpo supramencionado é divulgado em que todos os resíduos de risco baixo da cadeia pesada ou da cadeia leve ou de ambas são modificados, onde necessário, para serem os mesmos resíduos como uma sequência de imunoglobulina de referência humana. Também aqui divulgado é o anticorpo supramencionado em que todos os resíduos de risco baixo + moderado da cadeia pesada ou da cadeia leve ou de ambas são modificados, onde necessário, para serem os mesmos resíduos como uma sequência de imunoglobulina de referência humana. Uma cadeia pesada em que todos os resíduos de risco baixo foram modificados pode ser combinada com uma cadeia leve em que todos os resíduos de risco baixo e moderado foram modificados, e vice versa. De uma forma similar, uma cadeia leve ou pesada Human Engineered™ supracitada pode ser combinada com uma cadeia leve ou pesada de um anticorpo humanizado ou quimérico.

O anticorpo pode compreender uma sequência de aminoácidos de cadeia pesada variável que é pelo menos 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, ou 99% idêntica a uma das sequências de aminoácidos de cadeia pesada descritas imediatamente acima das Human Engineered™ de acordo com o método Studnicka. O anticorpo pode compreender uma sequência de aminoácidos de cadeia leve variável que é pelo menos 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, ou 99% idêntica a uma das sequências de aminoácidos de cadeia leve descritas imediatamente acima das Human Engineered™ de acordo com o método Studnicka.

Também aqui divulgado é um anticorpo compreendendo uma cadeia pesada tal como estabelecida acima e uma cadeia leve tal como estabelecida acima.

O anticorpo supramencionado pode ter uma Kd de afinidade de pelo menos 10^{-7} . O anticorpo pode ter uma Kd de afinidade de pelo menos 10^{-9} .

Também aqui divulgado é o anticorpo supramencionado que é um anticorpo policlonal; um anticorpo monoclonal incluindo um anticorpo Human Engineered™; um anticorpo humanizado; um anticorpo humano; um anticorpo quimérico; um fragmento Fab, F(ab')₂, Fv, ScFv ou SCA de anticorpo; um diacorpo; um anticorpo linear; ou uma muteína de qualquer um destes anticorpos. O anticorpo monoclonal pode ser um anticorpo isolado.

Também aqui divulgado é um ácido nucleico isolado compreendendo uma sequência de ácidos nucleicos codificando uma cadeia leve do anticorpo supramencionado. O ácido nucleico isolado pode compreender uma sequência de ácidos nucleicos de cadeia pesada que é pelo menos 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, ou 99% idêntica à sequência de nucleótidos de cadeia pesada estabelecida nas Figuras 4A, 13, 14, ou 15. O ácido nucleico isolado pode compreender uma sequência de ácidos nucleicos de cadeia leve que é pelo menos 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, ou 99% idêntica à sequência de nucleótidos de cadeia leve estabelecida nas Figuras 4A, 13, 14, ou 15.

Um vetor compreendendo o ácido nucleico isolado supramencionado é também divulgado. Também aqui divulgado é o vetor supramencionado em que o ácido nucleico isolado

está operativamente ligado a uma sequência reguladora de controlo. Também aqui divulgado é uma célula hospedeira compreendendo o vetor supramencionado.

São contemplados numerosos métodos. Por exemplo, um método para produzir um anticorpo supramencionado é divulgado, compreendendo cultivar a célula hospedeira supracitada de tal modo que o ácido nucleico isolado é expresso para produzir o anticorpo. O método pode compreender adicionalmente o passo de recuperar o anticorpo da cultura da célula hospedeira. Um anticorpo isolado produzido pelo método supramencionado é divulgado.

Um hibridoma que secreta um anticorpo supramencionado é também aqui divulgado. Adicionalmente, um anticorpo supramencionado que está conjugado com uma toxina é divulgado.

Também aqui divulgada é uma composição farmacêutica compreendendo qualquer um dos anticorpos supramencionados e um transportador, excipiente ou diluente farmacêuticamente adequado. A composição farmacêutica pode compreender adicionalmente um segundo agente terapêutico. Também aqui divulgada é uma composição farmacêutica em que o segundo agente terapêutico é um agente quimioterapêutico do cancro. Também aqui divulgada é uma composição farmacêutica em que o segundo agente terapêutico é um bisfosfonato. O segundo agente terapêutico pode ser outro anticorpo.

A invenção fornece um anticorpo da invenção para uso em aplicações terapêuticas que envolvam a administração *in vivo* a um humano.

Anticorpos da presente invenção são contemplados para terem numerosas características desejáveis para o tratamento de doenças e desordens. Também fornecidos são os anticorpos da invenção para uso em prevenir que um indivíduo sofrendo de uma doença que causa ou contribui para a osteólise, em que o anticorpo reduz eficazmente a severidade da perda óssea associada à doença. De uma forma similar, também fornecidos aqui são os anticorpos da invenção para uso no tratamento de um indivíduo sofrendo de uma doença que causa ou contribui para a osteólise, em que o referido anticorpo reduz eficazmente a severidade da perda óssea associada à doença.

Numerosas doenças e desordens são contempladas como sendo suscetíveis ao tratamento à base do anticorpo na presente invenção. O anticorpo da invenção pode ser fornecido sendo a doença selecionada do grupo que consiste em doenças metabólicas do osso associadas a uma atividade dos osteoclastos relativamente aumentada, incluindo endocrinopatias (hipercortisolismo, hipogonadismo, hiperparatiroidismo primário ou secundário, hipertireoidismo), hipercalcemia, estados de deficiência (raquitismo/osteomalacia, escorbuto, malnutrição), doenças crônicas (síndromes de má absorção, falência renal crônica (osteodistrofia renal), doença hepática crônica (osteodistrofia hepática), fármacos (glucocorticoides (osteoporose induzida por glucocorticoides), heparina, álcool), e doenças hereditárias (osteogénese imperfeita, homocistinúria), cancro, osteoporose, osteopetrose, inflamação do osso associada a artrite e artrite reumatóide, doença periodontal, displasia fibrosa, e/ou doença de Paget.

O anticorpo da invenção é fornecido para uso na prevenção e tratamento do cancro metastático para o osso, em que o

cancro metastático é da mama, do pulmão, renal, mieloma múltiplo, da tiroide, da próstata, adenocarcinoma, malignidades das células sanguíneas, incluindo leucemia e linfoma; cancros da cabeça e pescoço; cancros gastrointestinais, incluindo cancro esofágico, cancro do estômago, cancro do cólon, cancro intestinal, cancro coloretal, cancro retal, cancro do pâncreas, cancro do fígado, cancro do ducto biliar ou da vesícula biliar; malignidades do trato genital feminino, incluindo carcinoma do ovário, cancros endometriais uterinos, cancro vaginal, e cancro cervical; cancro da bexiga; cancro do cérebro, incluindo neuroblastoma; sarcoma, osteossarcoma; e cancro da pele, incluindo melanoma maligno ou cancro das células escamosas.

Também aqui divulgado é um método de rastreio para um anticorpo específico para M-CSF compreendendo os passos de contactar meio celular tumoral metastático, osteoclastos e um anticorpo candidato; detetar a formação de osteoclastos, proliferação e/ou diferenciação; e identificar o referido anticorpo candidato como um anticorpo específico para M-CSF se uma diminuição na formação de osteoclastos, proliferação e/ou diferenciação for detetada. De uma forma similar, o método supramencionado é divulgado sendo que o meio celular tumoral metastático inclui células tumorais.

O método supramencionado é divulgado sendo que o passo de contacto (a) ocorre *in vivo*, o referido passo de deteção (b) compreende a deteção do tamanho e/ou número de metástases ósseas, e o anticorpo candidato é identificado como um anticorpo específico para M-CSF se uma diminuição no tamanho e/ou número de metástases ósseas for detetado. Também aqui divulgado é o método supramencionado compreendendo adicionalmente o passo de determinar se o anticorpo candidato se liga a M-CSF. De uma forma similar, também aqui divulgado é o método supramencionado

compreendendo adicionalmente o passo de determinar se o referido anticorpo candidato inibe a interação entre M-CSF e o seu recetor M-CSFR.

Também aqui divulgado é um método para identificar um anticorpo específico para M-CSF que pode prevenir ou tratar o cancro metastático no osso, compreendendo os passos de: (a) detetar a ligação de um anticorpo candidato a um epítopo de M-CSF que inclui pelo menos 4 resíduos de aminoácidos contíguos 98-105 da Figura 12; e (b) testar a capacidade do referido anticorpo candidato de prevenir ou tratar o cancro metastático no osso *in vitro* ou *in vivo*.

Também aqui divulgado é um método para identificar um anticorpo específico para M-CSF que consiga prevenir ou tratar o cancro metastático no osso, compreendendo os passos de: (a) detetar a ligação de um anticorpo candidato a um epítopo de M-CSF que inclui pelo menos 4 resíduos contíguos de aminoácidos 65-73 ou 138-144 da Figura 12 (correspondente aos epítopos de M-CSF reconhecidos por 5H4 ou MC3); e (b) testar a capacidade do referido anticorpo candidato de prevenir ou tratar o cancro metastático no osso *in vitro* ou *in vivo*.

Também aqui divulgado é um método para modificar uma CDR de um anticorpo que se liga a um epítopo de M-CSF que inclui os aminoácidos 98-105 da Figura 12 compreendendo modificar um aminoácido dentro de uma CDR de uma sequência de aminoácidos estabelecida na Figura 4A e seleccionar um anticorpo que se liga a M-CSF com uma K_a de afinidade de pelo menos 10^{-7} .

Um método para modificar sistematicamente até 60% da sequência de aminoácidos de cadeia pesada estabelecida na

Figura 4A é divulgado, compreendendo modificar qualquer um de X₁-X₅₂ numa sequência de aminoácidos

X₁VX₂LX₃EX₄GX₅X₆X₇X₈X₉X₁₀X₁₁X₁₂X₁₃LX₁₄LX₁₅CX₁₆VX₁₇DYSITSDYAWNWX₁₈QX₁₉X₂₀X₂₁X₂₂X₂₃LX₂₄WMGYISYSGSTX₂₅NX₂₆X₂₇LX₂₈X₂₉X₃₀IX₃₁IX₃₂RX₃₃X₃₄X₃₅X₃₆X₃₇X₃₈FX₃₉LX₄₀LX₄₁X₄₂VX₄₃X₄₄X₄₅DX₄₆AX₄₇YYCASFDYAHAMDYWX₄₈GTX₄₉VX₅₀VX₅₁X₅₂ (SEQ ID NO: 133), e testar um anticorpo compreendendo a sequência de aminoácidos modificada quando à ligação a um epítipo de M-CSF que inclui os aminoácidos 98-105 da Figura 12.

Um método para modificar sistematicamente até 60% da sequência de aminoácidos de cadeia leve estabelecida na Figura 4A é divulgado, compreendendo modificar qualquer um de X₁-X₅₂ numa sequência de aminoácidos

X₁IX₂LX₃QX₄X₅X₆X₇X₈X₉VX₁₀X₁₁X₁₂X₁₃X₁₄VX₁₅FX₁₆CX₁₇AX₁₈QSIGTSHWYX₁₉QX₂₀X₂₁X₂₂X₂₃X₂₄PX₂₅LLIKYASEX₂₆X₂₇X₂₈X₂₉IX₃₀X₃₁X₃₂FX₃₃GX₃₄GX₃₅GX₃₆X₃₇FX₃₈LX₃₉IX₄₀X₄₁VX₄₂X₄₃X₄₄DX₄₅ADYYCQQINSWPTTFGX₄₆GTX₄₇LX₄₈X₄₉X₅₀X₅₁X₅₂ (SEQ ID NO: 134), e testar um anticorpo compreendendo a sequência de aminoácidos modificada quando à ligação a um epítipo de M-CSF que inclui os aminoácidos 98-105 da Figura 12.

Também aqui divulgado é um método para modificar uma CDR de um anticorpo que se liga a um epítipo de M-CSF que inclui os aminoácidos 65-73 ou 138-144 da Figura 12 (correspondentes aos epítipos de M-CSF reconhecidos por 5H4 ou MC3) compreendendo modificar um aminoácido dentro de uma CDR de uma sequência de aminoácidos estabelecida numa das Figuras 13, 14, e 15, e selecionar um anticorpo que se liga a M-CSF com uma Ka de afinidade de pelo menos 10⁻⁷. Um método para modificar sistematicamente até 60% da sequência de aminoácidos de cadeia pesada estabelecida numa das Figuras 13, 14, e 15 é divulgado, compreendendo modificar qualquer uma das sequências supramencionadas de acordo com os métodos estabelecidos em Studnicka et al., Patente U.S.

No. 5 766 886 e Exemplo 4A aqui, e de acordo com a numeração de Kabat estabelecida nas figuras 24C-24E, e testar um anticorpo compreendendo a sequência de aminoácidos modificada quanto à ligação a um epítipo de M-CSF que inclui os aminoácido 65-73 ou 138-144 da Figura 12 (correspondentes aos epítipos de M-CSF reconhecidos por 5H4 ou MC3). Todos os resíduos de risco baixo podem ser modificados. De uma forma similar, todos os resíduos de risco baixo ou moderado podem ser modificados, ou todos os resíduos de risco baixo ou moderado excluindo prolinas podem ser modificados.

Também aqui divulgado é um método para expressar um anticorpo contendo CDRs desenhadas pelo processo supramencionado. Uma composição farmacêutica compreendendo um anticorpo que se liga a MCSF, em que o referido anticorpo é produzido usando o método supramencionado, é divulgada.

A invenção fornece o uso do anticorpo da invenção no fabrico de um medicamento para prevenir ou reduzir a perda óssea num doente sofrendo de uma doença que causa ou contribui para a osteólise. Uma quantidade terapêuticamente eficaz de qualquer um dos anticorpos supramencionados pode ser usada, prevenindo ou reduzindo assim a perda óssea associada à doença. A invenção fornece o anticorpo da invenção para uso na prevenção ou tratamento de um indivíduo sofrendo de uma doença que causa ou contribui para a osteólise, em que o referido anticorpo reduz eficazmente a severidade da perda óssea associada à doença.

O uso supramencionado é fornecido sendo a doença selecionada do grupo que consiste em doenças metabólicas do osso associadas a uma atividade dos osteoclastos relativamente aumentada, incluindo endocrinopatias

(hipercortisolismo, hipogonadismo, hiperparatiroidismo primário ou secundário, hipertiroidismo), hipercalcemia, estados de deficiência (raquitismo/osteomalacia, escorbuto, malnutrição), doenças crónicas (síndromes de má absorção, falência renal crónica (osteodistrofia renal), doença hepática crónica (osteodistrofia hepática), fármacos (glucocorticoides (osteoporose induzida por glucocorticoides), heparina, álcool), e doenças hereditárias (osteogénese imperfeita, homocistinúria), cancro, osteoporose, osteopetrose, inflamação do osso associada a artrite e artrite reumatóide, doença periodontal, displasia fibrosa, e/ou doença de Paget.

[0047] A invenção fornece um anticorpo da invenção para uso na prevenção ou tratamento do cancro metastático no osso. Uma quantidade terapêuticamente eficaz de qualquer um dos anticorpos supramencionados pode ser administrada a um indivíduo sofrendo de cancro metastático. O cancro metastático pode ser da mama, do pulmão, renal, mieloma múltiplo, da tiroide, da próstata, adenocarcinoma, malignidades das células sanguíneas, incluindo leucemia e linfoma; cancros da cabeça e pescoço; cancros gastrointestinais, incluindo cancro esofágico, cancro do estômago, cancro do cólon, cancro intestinal, cancro colorretal, cancro retal, cancro do pâncreas, cancro do fígado, cancro do ducto biliar ou da vesícula biliar; malignidades do trato genital feminino, incluindo carcinoma do ovário, cancros endometriais uterinos, cancro vaginal, e cancro cervical; cancro da bexiga; cancro do cérebro, incluindo neuroblastoma; sarcoma, osteossarcoma; e cancro da pele, incluindo melanoma maligno ou cancro das células escamosas.

Um método para prevenir a perda óssea e crescimento tumoral é divulgado compreendendo administrar a um indivíduo que necessite quantidade terapêuticamente eficazes de qualquer

um dos anticorpos supramencionados. O método pode compreender adicionalmente administrar um segundo agente terapêutico. Também aqui divulgado é o método em que o segundo agente terapêutico é um agente quimioterapêutico de cancro ou um bisfosfonato. Também aqui divulgado é o método em que o bisfosfonato é zeledronato, pamidronato, clodronato, etidronato, tilundronato, alendronato, ou ibandronato. Também aqui divulgados são os métodos supramencionados em que o agente terapêutico é um agente quimioterapêutico citotóxico. Também aqui divulgado é o método supramencionado em que o indivíduo é impedido de receber tratamento com bisfosfonato.

O método supramencionado é divulgado em que o anticorpo é eficaz a reduzir a dosagem do segundo agente terapêutico necessária para atingir um efeito terapêutico. O segundo agente terapêutico pode ser um não fator estimulador de colónias M-CSF, por exemplo G-CSF, ou anticorpo anti-RANKL, ou recetor de RANKL solúvel.

Também aqui divulgados são os métodos supramencionados em que o indivíduo é um mamífero. O mamífero pode ser um humano.

Os métodos supramencionados são divulgados em que o anticorpo inibe a interação entre o M-CSF e o seu recetor (M-CSFR). O anticorpo pode inibir a proliferação de osteoclastos e/ou diferenciação induzida por células tumorais. Os métodos supramencionados são divulgados em que o anticorpo é administrado numa dosagem de cerca de 2 µg/kg a 30 mg/kg, 0,1 mg/kg a 30 mg/kg ou 0,1 mg/kg a 10 mg/kg de peso corporal.

É contemplado o uso de um anticorpo da invenção no fabrico de um medicamento para prevenir ou reduzir a perda óssea

num doente que exhibe sintomas de osteólise e no fabrico de um medicamento para tratar um doente sofrendo de uma de uma doença que causa ou contribui para a osteólise. O uso supramencionado é contemplado adicionalmente no qual a doença é selecionada de entre o grupo que consiste em doenças metabólicas do osso associadas a uma atividade dos osteoclastos relativamente aumentada, incluindo endocrinopatias (hipercortisolismo, hipogonadismo, hiperparatiroidismo primário ou secundário, hipertiroidismo), hipercalcemia, estados de deficiência (raquitismo/osteomalacia, escorbuto, malnutrição), doenças crónicas (síndromes de má absorção, falência renal crónica (osteodistrofia renal), doença hepática crónica (osteodistrofia hepática), fármacos (glucocorticoides (osteoporose induzida por glucocorticoides), heparina, álcool), e doenças hereditárias (osteogénese imperfeita, homocistinúria), cancro, osteoporose, osteopetrose, inflamação do osso associada a artrite e artrite reumatóide, doença periodontal, displasia fibrosa, e/ou doença de Paget.

É contemplado o uso de um anticorpo da invenção no fabrico de um medicamento para prevenir ou tratar do cancro metastático para o osso, em que o cancro metastático é da mama, do pulmão, renal, mieloma múltiplo, da tiroide, da próstata, adenocarcinoma, malignidades das células sanguíneas, incluindo leucemia e linfoma; cancros da cabeça e pescoço; cancros gastrointestinais, incluindo cancro esofágico, cancro do estômago, cancro do cólon, cancro intestinal, cancro colo-retal, cancro retal, cancro do pâncreas, cancro do fígado, cancro do ducto biliar ou da vesícula biliar; malignidades do trato genital feminino, incluindo carcinoma do ovário, cancros endometriais uterinos, cancro vaginal, e cancro cervical; cancro da bexiga; cancro do cérebro, incluindo neuroblastoma;

sarcoma, osteossarcoma; e cancro da pele, incluindo melanoma maligno ou cancro das células escamosas.

É contemplado o uso de um anticorpo da invenção no fabrico de um medicamento para tratar um doente com cancro.

Em qualquer um dos usos supramencionados, o medicamento pode ser coordenado com o tratamento usando um segundo agente terapêutico. O segundo agente terapêutico pode ser um agente quimioterapêutico do cancro. O segundo agente terapêutico pode ser um não fator estimulador de colónias M-CSF, por exemplo pode ser um não fator estimulador de colónias M-CSF, por exemplo, ou um anticorpo anti-RANKL, ou um recetor de RANKL solúvel, ou um bisfosfonato. O bifosfonato pode ser zeledronato, pamidronato, clodronato, etidronato, tilundronato, alendronato, ou ibandronato.

Qualquer um dos usos supramencionados é contemplado no qual o doente é impedido de receber tratamento com bifosfonato, e/ou em que o doente foi pré-tratado com o segundo agente terapêutico. O segundo agente terapêutico pode ser um agente quimioterapêutico do cancro, um não fator estimulador de colónias M-CSF, ou anticorpo anti-RANKL, ou recetor de RANKL solúvel, ou um bisfosfonato. O bifosfonato pode ser zeledronato, pamidronato, clodronato, etidronato, tilundronato, alendronato, ou ibandronato. O doente pode ser impedido de receber tratamento com bisfosfonato.

Também aqui contemplado é o uso de uma combinação sinérgica de um anticorpo da invenção para preparação de um medicamento para tratar um doente que exhibe sintomas de osteólise em que o medicamento é coordenado com o tratamento que usa um segundo agente terapêutico. O segundo agente terapêutico pode ser um agente quimioterapêutico do

cancro, um não fator estimulador de colónias M-CSF, ou anticorpo anti-RANKL, ou recetor de RANKL solúvel, ou um bisfosfonato. O bisfosfonato pode ser zeledronato, pamidronato, clodronato, etidronato, tilundronato, alendronato, ou ibandronato. O doente pode ser impedido de receber tratamento com bisfosfonato.

Os usos supramencionado são contemplados nos quais a quantidade de anticorpo no medicamento é numa dosagem eficaz para reduzir a dosagem do segundo agente terapêutico necessária para atingir um efeito terapêutico. Em qualquer um dos usos supramencionado referentes à perda óssea associada ao cancro, a quantidade de anticorpo no medicamento é preferencialmente eficaz para inibir a proliferação e/ou diferenciação de osteoclastos induzida pelas células tumorais.

A quantidade de anticorpo em qualquer um dos medicamentos supramencionados pode ser numa dosagem de cerca de 2 µg/kg a 30 mg/kg de peso corporal. A quantidade de anticorpo no medicamento pode ser numa dosagem de cerca de 0,1 mg/kg a 30 mg/kg de peso corporal. A quantidade de anticorpo no medicamento pode ser numa dosagem de cerca de 0,1 mg/kg a 10 mg/kg de peso corporal.

São também contemplados *kits* pela divulgação. Um *kit* compreendendo uma quantidade terapêuticamente eficaz de um anticorpo da divulgação, embalado num recipiente, tal como uma ampola ou frasco, e compreendendo adicionalmente uma etiqueta colada ao recipiente ou embalada com o mesmo, a etiqueta descrevendo os conteúdos do recipiente e fornecendo indicações e/ou instruções referentes ao uso dos conteúdos do recipiente para prevenir ou reduzir perda óssea, é divulgado.

Um *kit* compreendendo uma quantidade terapêuticamente eficaz de um anticorpo da divulgação, embalado num recipiente, tal como uma ampola ou frasco, e compreendendo adicionalmente uma etiqueta colada ao recipiente ou embalada com o mesmo, a etiqueta descrevendo os conteúdos do recipiente e fornecendo indicações e/ou instruções referentes ao uso dos conteúdos do recipiente para um doente que sofre de uma doença que causa ou contribui para a osteólise é divulgado.

O *kit* é divulgado no qual a referida doença é selecionada do grupo que consiste em doenças metabólicas do osso associadas a uma atividade dos osteoclastos relativamente aumentada, incluindo endocrinopatias (hipercortisolismo, hipogonadismo, hiperparatiroidismo primário ou secundário, hipertiroidismo), hipercalcemia, estados de deficiência (raquitismo/osteomalacia, escorbuto, malnutrição), doenças crónicas (síndromes de má absorção, falência renal crónica (osteodistrofia renal), doença hepática crónica (osteodistrofia hepática), fármacos (glucocorticoides (osteoporose induzida por glucocorticoides), heparina, álcool), e doenças hereditárias (osteogénese imperfeita, homocistinúria), cancro, osteoporose, osteopetrose, inflamação do osso associada a artrite e artrite reumatoide, doença periodontal, displasia fibrosa, e/ou doença de Paget.

Um *kit* é divulgado compreendendo uma quantidade terapêuticamente eficaz de um anticorpo da divulgação, embalado num recipiente, tal como uma ampola ou um frasco, e compreendendo adicionalmente uma etiqueta colada ao recipiente ou embalada com o mesmo, a etiqueta descrevendo os conteúdos do recipiente e fornecendo indicações e/ou instruções referentes ao uso dos conteúdos do recipiente para prevenir ou tratar cancro metastático no osso. O

cancro metastático pode ser da mama, do pulmão, renal, mieloma múltiplo, da tiroide, da próstata, adenocarcinoma, malignidades das células sanguíneas, incluindo leucemia e linfoma; cancros da cabeça e pescoço; cancros gastrointestinais, incluindo cancro esofágico, cancro do estômago, cancro do cólon, cancro intestinal, cancro coloretal, cancro retal, cancro do pâncreas, cancro do fígado, cancro do ducto biliar ou da vesícula biliar; malignidades do trato genital feminino, incluindo carcinoma do ovário, cancros endometriais uterinos, cancro vaginal, e cancro cervical; cancro da bexiga; cancro do cérebro, incluindo neuroblastoma; sarcoma, osteossarcoma; e cancro da pele, incluindo melanoma maligno ou cancro das células escamosas.

Um *kit* é divulgado compreendendo uma quantidade terapêuticamente eficaz de anticorpo da divulgação, embalado num recipiente, tal como uma ampola ou um frasco, e compreendendo adicionalmente uma etiqueta colada ao recipiente ou embalada com o mesmo, a etiqueta descrevendo os conteúdos do recipiente e fornecendo indicações e/ou instruções referentes ao uso dos conteúdos do recipiente para tratar o cancro.

O *kit* pode compreender adicionalmente um segundo agente terapêutico. O segundo agente terapêutico pode ser um agente quimioterapêutico do cancro, um não fator estimulador de colónias M-CSF, ou anticorpo anti-RANKL, ou recetor de RANKL solúvel, ou um bisfosfonato. O bisfosfonato pode ser zeledronato, pamidronato, clodronato, etidronato, tilundronato, alendronato, ou ibandronato. O *kit* pode incluir instruções para tratar um doente impedido de receber tratamento com bisfosfonato.

O *kit* supramencionado pode compreender uma dosagem de anticorpo eficaz para reduzir a dosagem de um segundo agente terapêutico necessária para atingir um efeito terapêutico. O *kit* pode compreender uma dosagem sinérgica de anticorpo. O *kit* pode compreender uma dosagem de anticorpo eficaz para inibir a proliferação e/ou diferenciação de osteoclastos induzida por células tumorais.

O *kit* supramencionado pode compreender um dosagem de anticorpo de cerca de 2 µg/kg a 30 mg/kg de peso corporal. O *kit* pode compreender uma dosagem de anticorpo de cerca de 0,1 mg/kg a 30 mg/kg de peso corporal. O *kit* pode compreender uma dosagem de anticorpo de cerca de 0,1 mg/kg a 10 mg/kg de peso corporal.

Também aqui divulgada é uma embalagem, ampola ou recipiente compreendendo um medicamento compreendendo um ou mais dos anticorpos supramencionado e instruções de que o medicamento deverá ser usado em combinação com cirurgia ou radioterapia. Um método para prevenir ou tratar cancro metastático no osso compreendendo os passos de administrar qualquer um dos anticorpos supramencionados a um indivíduo e tratar o indivíduo com cirurgia ou radioterapia é divulgado. Um método de se direcionar contra uma célula tumoral que expressa M-CSF ligado à membrana na sua superfície é divulgado compreendendo o passo de administrar qualquer um dos anticorpos supramencionados, em que o anticorpo é conjugado com um radioisótopo ou outra toxina. Um método para tratar um indivíduo que sofre de um cancro é divulgado, compreendendo administrar uma quantidade terapêuticamente eficaz de qualquer um dos anticorpos supramencionados.

A invenção também fornece o uso do anticorpo da invenção no fabrico de um medicamento para prevenir a perda óssea num doente que exhibe osteólise. Um dos anticorpos supramencionados pode ser administrado a um indivíduo que sofre de uma doença que causa ou contribui para a osteólise numa quantidade eficaz para neutralizar M-CSF produzido pelas células do indivíduo, sendo essa quantidade superior à quantidade eficaz para neutralizar M-CSF produzido pelas células cancerosas. A invenção também fornece o uso de um anticorpo da invenção no fabrico de um medicamento para tratar um doente que sofre de uma doença que causa ou contribui para a osteólise. Qualquer um dos anticorpos supramencionados pode ser administrado ao referido indivíduo numa quantidade eficaz para neutralizar M-CSF produzido pelas células do indivíduo, sendo essa quantidade superior à quantidade eficaz para neutralizar M-CSF produzido pelas células cancerosas.

Também aqui divulgada é uma composição farmacêutica compreendendo um anticorpo RX1, 5H4, MC1 e/ou MC3, ou um anticorpo não murino derivado de RX1, 5H4, MC1 e/ou MC3 ou um anticorpo competidor RX1, 5H4, MC1 e/ou MC3, e um agente terapêutico do cancro. Também aqui divulgado é uma embalagem, ampola ou recipiente compreendendo um medicamento compreendendo um anticorpo RX1, 5H4, MC1 e/ou MC3, ou um anticorpo não murino derivado de RX1, 5H4, MC1 e/ou MC3 ou um anticorpo competidor com RX1, 5H4, MC1 e/ou MC3, e instruções de que o medicamento deverá ser usado em combinação com cirurgia ou radioterapia.

Também aqui divulgado é um método para tratar um indivíduo que sofre de cancro, em que as células compreendendo o cancro não secretam M-CSF, compreendendo o passo de administrar qualquer um dos anticorpos supramencionados.

BREVE DESCRIÇÃO DAS FIGURAS

A Figura 1 representa um diagrama de topologia que mostra as ligações dissulfeto em M-CSF dimérico truncado.

A Figura 2 é um estereodiagrama da cadeia principal C-alfa de M-CSF com cada décimo resíduo marcado e com o eixo de simetria não cristalográfico indicado por uma linha de pontos.

A Figura 3 é uma comparação da atividade de indução dos osteoclastos entre M-CSF purificado e meio condicionado (CM) de células MDA 231 e células MCF7.

A Figura 4A mostra uma sequência de aminoácidos de um anticorpo murino RX1 específico para M-CSF (SEQ ID NOs: 2 e 4) (codificado pela inserção de cDNA do plasmídeo depositado na American Type Culture Collection, Manassas, VA, USA, sob o número de depósito ATCC PTA-6113) e uma sequência de ácidos nucleicos correspondente (SEQ ID NOs: 1 e 3). As regiões CDR estão numeradas e são mostradas a negrito.

A Figuras 4B e 4C mostram sequências de aminoácidos das cadeias leve (SEQ ID NO: 5) e pesada (SEQ ID NO: 6) de um anticorpo murino RX1 específico para M-CSF, respectivamente, resíduos com elevado risco (negrito), risco moderado (sublinhado), e risco baixo identificados de acordo com Studnicka et al., W093/11794.

A Figura 5A mostra que os anticorpos de M-CSF RX1 e 5A1 são específicos da espécie. A Figura 5B mostra a neutralização da atividade dos anticorpos MC1 e MC3.

A Figura 6 mostra que o anticorpo RX1 inibe eficazmente a osteólise num modelo de xenoenxerto humano a uma concentração de 5mg/kg.

A Figura 7 mostra que o número de metástases é reduzido quando o anticorpo RX1 é administrado a ratinhos *nude* portadores de cancro da mama humano MDA-MB-231 a uma concentração de 5 mg/kg.

As Figuras 8A e 8B mostram que um anticorpo específico para M-CSF ligado à linha celular de cancro da mama humano MDA-MB-231 ou à linha celular de mieloma múltiplo ARH77.

A Figura 9 mostra que M-CSF é prevalente num número de superfícies de células cancerosas.

A Figura 10 é uma sequência de aminoácidos de M-CSF α (SEQ ID NO: 7).

A Figura 11 é uma sequência de aminoácidos de M-CSF β (SEQ ID NO: 8).

A Figura 12 é uma sequência de aminoácidos de M-CSF γ (SEQ ID NO: 9). Um número de polimorfismos na sequência de DNA pode resultar em diferenças nos aminoácidos. Por exemplo, um polimorfismo comum fornece Ala em vez de Pro na posição 104.

As Figuras 13, 14, e 15 mostram sequências de aminoácidos de anticorpos murinos específicos para M-CSF 5H4 (SEQ ID NOs: 10 e 11), MC1 (SEQ ID NOs: 12 e 13) (produzido pelo hibridoma depositado sob o número de depósito ATCC PTA-6263) e MC3 (SEQ ID NOs: 14 e 15) (produzido pelo hibridoma

depositado sob o número de depósito ATCC PTA-6264), respectivamente.

As Figuras 16A e B representam um alinhamento de regiões CDR das sequências de aminoácidos da cadeia pesada e leve de anticorpos murinos específicos para M-CSF humano RX1; 5H4; MC1; e MC3 (SEQ ID NOs: 16-38).

A Figura 17 mostra as atividades de neutralização de intacto versus fragmentos Fab para RX1 versus 5H4.

A Figura 18 mostra a estrutura de M-CSF com os epítomos de RX1, 5H4, e MC3 realçados (SEQ ID NOs: 120, 122, e 123).

A Figura 19A mostra (a) a linha de risco para a cadeia pesada de RX1 murino (H=risco elevado, M=risco moderado, L=risco baixo), (b) a sequência de aminoácidos da cadeia pesada de RX1 (SEQ ID NO: 6), (c) a sequência de aminoácidos da sequência consenso humana mais próxima, Kabat Vh2 consenso, alinhado com RX1 (SEQ ID NO: 39) e (d) as modificações que foram realizadas para produzir duas sequências Human Engineered™ exemplificativas (SEQ ID NOs: 41 e 43). A Figura 19B mostra as sequências de aminoácidos das duas sequências de cadeia pesada Human Engineered™ exemplificativas (SEQ ID NOs: 41 e 43), designadas "risco baixo" e "risco baixo+moderado" bem como as sequências de ácidos nucleicos correspondentes (SEQ ID NOs: 40 e 42).

A Figura 20A mostra (a) a linha de risco para a cadeia leve de RX1 murino (H=risco elevado, M=risco moderado, L=risco baixo), (b) a sequência de aminoácidos da cadeia leve de RX1 (SEQ ID NO: 5), (c) a sequência de aminoácidos da sequência consenso humana mais próxima, Kabat Vk3 consenso, alinhado com RX1 (SEQ ID NO: 49) e (d) as modificações que foram realizadas para produzir duas sequências Human

Engineered™ exemplificativas (SEQ ID NOs: 45 e 47). A Figura 20B mostra as sequências de aminoácidos das duas sequências de cadeia leve Human Engineered™ exemplificativas (SEQ ID NOs: 45 e 47), designadas "risco baixo" e "risco baixo+moderado" bem como as sequências de ácidos nucleicos correspondentes (SEQ ID NOs: 44 e 46).

A Figura 21A mostra (a) a linha de risco para a cadeia leve de RX1 murino (H=risco elevado, M=risco moderado, L=risco baixo), (b) a sequência de aminoácidos da cadeia leve de RX1 (SEQ ID NO: 5), (c) a sequência de aminoácidos da sequência consenso humana mais próxima, Kabat Vk3 consenso, alinhada com RX1 (SEQ ID NO: 49) e (d) uma sequência de aminoácidos exemplificativa alternativa na qual as posições 54-56 não foram modificadas (i.e. permanece a sequência murina) (SEQ ID NO: 48). A Figura 21B mostra as sequências de aminoácidos de duas sequências Human Engineered™ exemplificativas alternativas (SEQ ID NOs: 48, 136), bem como as sequências de ácidos nucleicos correspondentes (SEQ ID NOs: 137 e 135).

A Figura 22A mostra (a) a linha de risco para a cadeia leve de RX1 murino (H=risco elevado, M=risco moderado, L=risco baixo), (b) a sequência de aminoácidos da cadeia leve de RX1 a sequência de aminoácidos da cadeia leve de RX1 (SEQ ID NO: 5), (c) a sequência de aminoácidos da sequência de linha germinal consenso humana mais próxima, Subgrupo Vk6 2-1-(1) A14, alinhado com RX1 (SEQ ID NO: 50) e (d) modificações que foram realizadas para produzir sequências Human Engineered™ exemplificativas (SEQ ID NOs: 51 e 53). A Figura 22B mostra as sequências de aminoácidos das duas sequências Human Engineered™ de cadeia leve exemplificativas (SEQ ID NOs: 51 e 53), designadas "risco baixo" e "risco baixo+moderado" bem como as sequências de ácidos nucleicos correspondentes (SEQ ID NO: 52).

A Figuras 23A e 23B o alinhamento da sequência de aminoácidos de cadeia leve de RX1 murina (SEQ ID NO: 54) com várias sequências consenso humanas e sequências consenso de linha germinal usando o sistema de numeração de Kabat (numeração de aminoácidos indicada na linha designada "POS") (SEQ ID NOs: 55-82).

A Figuras 24A e 24B mostram o alinhamento da sequência de aminoácidos de cadeia pesada de RX1 murina (SEQ ID NO: 83) com várias sequências consenso humanas e sequências de consenso de linha germinal humanas usando o sistema de numeração de Kabat (numeração de aminoácidos indicada na linha designada "POS") (SEQ ID NOs: 84-112). As Figuras 24C-24E mostram como os resíduos de aminoácidos dos anticorpos 5H4, MC1 e MC3 correspondem ao sistema de numeração de Kabat (SEQ ID NOs: 10 e 11; SEQ ID NOs: 12 e 13; SEQ ID NOs: 14 e 15, respectivamente).

A Figura 25 mostra a neutralização comparativa de MCSF humano recombinante pelo anticorpo murino recombinante RX1, marcado como rmRX1, e três versões de anticorpos Human Engineered™ RX1-1 (nas quais todas as modificações de risco baixo foram realizadas) cada uma tendo uma região constante diferente (IgG1, IgG2 ou IgG4), marcadas como heRX1-1.G1, heRX1-1.G2, e heRX1-1.G4.

A Figura 26 mostra a neutralização comparativa de soro humano pelo anticorpo murino recombinante RX1, marcado como rmRX1 e várias versões diferentes de heRX1-1 (nas quais todas as modificações de risco baixo foram realizadas) cada uma tendo uma região constante diferente (IgG1, IgG2 ou IgG4), marcadas como RX2, RX1-1-IgG2, RX1-1-IgG1, RX1-1-IgG1, RX1-1-IgG4, RX1-a-IgG4.

A Figura 27 mostra a neutralização comparativa de meio de MDA231 (linha celular de cancro da mama) pelo anticorpo murino recombinante RX1, rmRX1, e várias versões diferentes de heRX1-1 (nas quais todas as modificações de baixo risco foram realizadas) cada uma tendo uma região constante diferente (IgG1, IgG2 ou IgG4), marcadas como RX2, RX1-1-IgG2, RX1-1-IgG1, RX1-1-IgG1, RX1-1-IgG4, RX1-a-IgG4.

A Figura 28 mostra o efeito na osteoclastogénese (medida pela atividade de TRAP) do anticorpo murino recombinante RX1, rmRX1, e duas versões diferentes de heRX1-1 cada uma tendo uma região constante diferente (Ig1 ou IgG2), marcadas como heRX1-1.IgG1 e heRX1-1.IgG2.

A Figura 29A mostra a sequência de aminoácidos (SEQ ID NO: 114) e de nucleótidos (SEQ ID NO: 113) para heRX1-1.IgG1 com modificações de aminoácidos de risco baixo. A Figura 29B mostra a sequência de aminoácidos (SEQ ID NO: 116) e de nucleótidos (SEQ ID NO: 115) para heRX1-10.IgG1 com modificações de aminoácidos de risco baixo + moderado.

A Figura 30 mostra a sequência de aminoácidos (SEQ ID NO: 119) e de nucleótidos (cDNA (SEQ ID NO: 118) e DNA genómico (SEQ ID NO: 117)) para heRX1-1.IgG4 com modificações de aminoácidos de risco baixo.

DESCRIÇÃO DETALHADA

A capacidade de metastizar é uma característica que define o cancro. Metástase refere-se ao alastramento das células do cancro para outras partes do corpo ou à condição produzida por este alastramento. A metástase é um processo multi-passo complexo que inclui modificações no material

genético de uma célula, proliferação descontrolada da célula modificada para formar um tumor primário, desenvolvimento de um novo fornecimento de sangue para o tumor primário, invasão do sistema circulatório pelas células do tumor primário, dispersão de pequenos blocos de células do tumor primário para outras partes do corpo, e o crescimento de tumores secundários nesses locais.

O osso é um dos sítios mais comuns de metástases nos câncros da mama, pulmão, próstata e tireoide, bem como outros câncros, e em autópsias tanto quanto 60% dos doentes de cancro têm metástases. Metástase osteolítica no osso mostra um passo único da reabsorção osteoclástica do osso que não é observada em metástases noutros órgãos. A perda óssea associada à metástase do cancro é mediada por osteoclastos (células gigantes multinucleadas com a capacidade de reabsorver tecidos mineralizados), os quais parecem ser ativados por produtos tumorais.

Descobriu-se que o fator estimulador de colónias (CSF-1), também conhecido como o fator estimulador de colónias de macrófagos (M-CSF), é crucial para a formação de osteoclastos. Adicionalmente, o M-CSF aparenta modular as funções osteoclásticas dos osteoclastos maduros, a sua migração e a sua sobrevivência em cooperação com outros fatores solúveis e interações célula para célula fornecidas por osteoblastos e fibroblastos (Fixe e Praloran, *Cytokine* 10: 3-7, 1998; Martin et al., *Critical Rev. in Eukaryotic Gene Expression* 8: 107-23 (1998)).

O mRNA de M-CSF humano na sua sequência completa codifica um precursor de proteína de aminoácidos. Através de *splicing* alternativo de mRNA e processamento proteolítico pós-traducional diferencial, o M-CSF pode ser ou secretado como glicoproteína ou sulfato de condroitina contendo

proteoglicano para a circulação ou ser expresso como glicoproteína transmembranar na superfície de células produtoras de M-CSF. A estrutura tridimensional dos 150 aminoácidos de M-CSF humano expresso bacterianamente no terminal amino, a sequência mínima necessária para a atividade biológica completa *in vitro*, indica que esta proteína é um dímero ligado por ligações dissulfeto com cada monómero consistindo em quatro feixes helicoidais alfa e uma folha beta anti-paralela (Pandit et al., Science 258: 1358-62 (1992)). Três espécies distintas de M-CSF são produzidas através de *splicing* alternativo de mRNA. Os três precursores polipeptídicos de M-CSF α de 256 aminoácidos, M-CSF β de 554 aminoácidos, e M-CSF γ de 438 aminoácidos. M-CSF β é uma proteína secretada que não ocorre numa forma ligada à membrana. M-CSF α é expresso como uma proteína da membrana integral que é libertada lentamente por clivagem proteolítica. M-CSF α é clivado nos aminoácidos 191-197 na sequência estabelecida na Figura 10. A forma ligada à membrana de M-CSF pode interagir com recetores em células próximas e assim mediar contactos específicos célula para célula. O termo "M-CSF" pode também incluir os aminoácidos 36-438 da Figura 12.

Várias formas de M-CSF funcionam através da ligação ao seu recetor M-CSFR em células alvo. M-CSFR é uma molécula transmembranar com cinco domínios extracelulares do tipo imunoglobulina, um domínio transmembranar e um domínio interrompido intracelular tirosina cinase relacionado com Src. M-CSFR é codificado pelo proto-oncogene *c-fms*. A ligação de M-CSF ao domínio extracelular de M-CSFR leva à dimerização do recetor, que ativa o domínio cinase citoplasmático, levando à auto-fosforilação e fosforilação de outras proteínas celulares (Hamilton J. A., J Leukoc

Biol., 62(2):145-55 (1997); Hamilton J, A., Immuno Today., 18(7): 313-7(1997).

As proteínas celulares fosforiladas induzem uma cascata de eventos bioquímicos que conduzem a respostas celulares: mitose, secreção de citocinas, *ruffling* da membrana, e regulação da transcrição do seu próprio recetor (Fixe e Praloran, Cytokine 10: 32-37 (1998)).

M-CSF é expreso em células estromais, osteoblastos, e outras células. É também expreso em células tumorais da mama, do útero, e do ovário. A extensão da expressão nestes tumores correlaciona-se com um grau elevado e um mau prognóstico (Kacinski Ann. Med. 27: 79-85 (1995); Smith et al., Clin. Cancer Res. 1: 313-25 (1995)). Nos carcinomas da mama, a expressão de M-CSF é prevalente em células tumorais invasivas em oposição ao cancro intraductal (pré-invasivo) (Scholl et al., J. Natl. Cancer Inst. 86: 120-6 (1994)). Adicionalmente, M-CSF mostra promover a progressão de tumores mamários para a malignidade (Lin et al., J. Exp. Med. 93: 727-39 (2001)). Para o cancro da mama e do ovário, a produção de M-CSF parece ser responsável pelo recrutamento de macrófagos para o tumor.

Tal como mostrado aqui, um anticorpo específico para M-CSF tal como um anticorpo RX1, 5H4, MC1 ou MC3, neutraliza a indução de osteoclastos por célula de cancro metastático e/ou reduz metástases no osso em modelos animais de cancro. Deste modo, aqui divulgados são composições e métodos para tratar ou prevenir o cancro, metástases de cancro e perda óssea associada à metástase de cancro.

Um anticorpo anti-M-CSF murino RX1 preferido foi modificado para ser menos imunogénico em humanos com base no método Human Engineering™ de Studnicka et al. Preferencialmente, 8

a 12 resíduos de aminoácido de uma região variável da cadeia pesada expostos à superfície e 16 a 19 resíduos de aminoácido de uma região da cadeia leve foram modificados para resíduos humanos em posições determinadas como sendo improváveis de efetuar ou ligação a antigénio ou *folding* de proteínas, ao mesmo tempo que reduz a sua imunogenicidade com respeito a um ambiente humano. Genes sintéticos contendo regiões variáveis modificadas de cadeia pesada e/ou cadeia leve foram construídos e ligados a regiões constantes de cadeia pesada γ e/ou cadeia leve kappa humana. Quaisquer regiões constantes de cadeia pesada e cadeia leve humanas podem ser usadas em combinação com as regiões variáveis do anticorpo Human Engineered™. Os genes humanos de cadeia pesada e cadeia leve foram introduzidos em células de mamíferos e os produtos de imunoglobulina recombinante resultantes foram obtidos e caracterizados. Outros anticorpos anti-M-CSF exemplificativos como 5H4, MC1 ou MC3 são, de uma forma similar, Human Engineered™.

O termo "anticorpo derivado de RX1" inclui qualquer um dos seguintes:

1) uma variante de aminoácido de anticorpo murino RX1 tendo uma sequência de aminoácidos estabelecida na Figura 4, incluindo variantes compreendendo uma sequência de aminoácidos de cadeia pesada variável que é pelo menos 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, ou 99% homóloga a uma sequência de aminoácidos tal como estabelecida na Figura 4, e/ou compreendendo sequência de aminoácidos de cadeia leve variável que é pelo menos 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, ou 99% homóloga a uma sequência de aminoácidos tal como estabelecida na Figura 4, tendo em conta aminoácidos similares para a determinação da homologia:

2) Péptidos de ligação a M-CSF (excluindo o anticorpo murino RX1) compreendendo uma ou mais regiões determinantes de complementaridade (CDRs) com o anticorpo murino RX 1 tendo uma sequência de aminoácidos estabelecida na Figura 4, preferencialmente compreendendo pelo menos CDR3 da cadeia pesada de RX 1, e preferencialmente compreendendo dois ou mais, ou três ou mais, ou quatro ou mais, ou cinco ou mais, ou todas as seis CDRs;

3) anticorpos Human Engineered™ tendo as sequências de aminoácidos de cadeia pesada e leve definidas nas Figuras 19B a 22B ou variantes das mesmas compreendendo a cadeia pesada ou leve tendo pelo menos 60% de identidade da sequência de aminoácidos com a cadeia pesada ou a leve Human Engineered™ das Figuras 19B a 22B, mais preferencialmente pelo menos 80%, mais preferencialmente pelo menos 85%, mais preferencialmente pelo menos 90%, e ainda mais preferencialmente pelo menos 95%, incluindo por exemplo, 65%, 70%, 75%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, e 100% idênticas;

4) Polipéptidos que se ligam a M-CSF (excluindo o anticorpo murino RX1) compreendendo o resíduos de risco elevado uma ou mais CDRs dos anticorpos Human Engineered™ das Figuras 19B a 22B, e preferencialmente compreendendo resíduos de risco elevado de dois ou mais, ou três ou mais, ou quatro ou mais, ou cinco ou mais, ou todas as seis CDRs;

5) anticorpos Human Engineered™ ou variantes retendo os resíduos de aminoácidos risco elevado definidos na Figura 4B, e compreendendo uma ou mais modificações nos resíduos de risco baixo ou moderado definidas na Figura 4B;

por exemplo, compreendendo uma ou mais modificações num resíduo de risco baixo e substituições conservativas num resíduo de risco moderado definido na Figura 4B, ou

por exemplo, retendo os resíduos de aminoácido de risco moderado e elevado definidos na Figura 4B e compreendendo uma ou mais modificações num resíduo de baixo risco,

em que modificações incluem inserções, eliminações ou substituições que podem ser substituições conservativas ou podem causar que o anticorpo modificado (*engineered*) seja mais próximo na sequência a uma sequência de cadeia leve ou cadeia pesada humana, uma sequência cadeia leve ou cadeia pesada de linha germinal humana, uma sequência cadeia leve ou cadeia pesada humana consenso, ou uma sequência de cadeia leve ou cadeia pesada de linha germinal humana consenso;

que retêm a capacidade de se ligar a M-CSF. Tais anticorpos ligam-se preferencialmente a M-CSF com uma afinidade de pelo menos 10^{-7} , 10^{-8} ou 10^{-9} ou superior e preferencialmente neutralizam a atividade indutora de osteoclastogênese de M-CSF.

De uma forma similar, o termo "anticorpo derivado de MC3" inclui qualquer um dos seguintes:

- 1) Uma variante de aminoácido de anticorpo murino MC3 tendo uma sequência de aminoácidos definida na Figura 15, incluindo variantes compreendendo uma sequência de aminoácidos de cadeia pesada variável que é pelo menos 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, ou 99% homóloga a uma sequência de aminoácidos tal como estabelecida na Figura 15, e/ou compreendendo uma sequência de aminoácidos de cadeia leve variável que é pelo menos 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, ou 99% homóloga a uma sequência de aminoácidos tal como

estabelecida na Figura 15, tendo em conta aminoácidos similares para a determinação de homologia;

2) Polipéptidos que se ligam a M-CSF (opcionalmente incluindo ou excluindo o anticorpo murino MC3) compreendendo um ou mais regiões determinantes de complementaridade (CDRs) do anticorpo murino MC3 tendo a sequência de aminoácidos definida na Figura 15, preferencialmente compreendendo pelo menos CDR3 da cadeia pesada de MC3, e preferencialmente compreendendo duas ou mais, ou três ou mais, ou quatro ou mais, ou cinco ou mais, ou todas as seis CDRs;

3) Anticorpos Human Engineered™ gerados pela modificação da sequência murina de acordo com os métodos estabelecidos em Studnicka et al., Patente U.S. No. 5 766 886 e Exemplo 4A aqui, usando a numeração de Kabat estabelecida nas figuras 24C-24E para identificar resíduos de risco baixo, moderado e elevado; tais anticorpos compreendendo pelo menos uma das seguintes cadeia pesadas e pelo menos uma das seguintes cadeia leves: (a) uma cadeia pesada na qual todos os resíduos de baixo risco foram modificados, se necessário, para serem os mesmos resíduos como uma sequência de imunoglobulina humana de referência ou (b) uma cadeia pesada em que todos os resíduos de risco baixo e moderado foram modificados, se necessário, para serem os mesmos resíduos como uma sequência de imunoglobulina humana de referência, (c) uma cadeia leve em que todos os resíduos de risco baixo foram modificados, se necessário, para serem os mesmos resíduos como uma sequência de imunoglobulina humana de referência ou (b) uma cadeia leve em que todos os resíduos de risco baixo e moderado foram modificados, se necessário, para serem os mesmos resíduos como uma sequência de imunoglobulina humana de referência

4) Variantes dos anticorpos supramencionados no parágrafo anterior (3) compreendendo a cadeia pesada ou leve tendo pelo menos 60% de identidade de sequência de aminoácidos com a cadeia pesada ou a leve Human Engineered™ original, mais preferencialmente pelo menos 80%, mais preferencialmente pelo menos 85%, mais preferencialmente pelo menos 90%, e ainda mais preferencialmente pelo menos 95%, incluindo por exemplo, 65%, 70%, 75%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, e 100% idênticas;

5) Polipéptidos que se ligam a M-CSF (opcionalmente incluindo ou excluindo o anticorpo murino MC3) compreendendo os resíduos de risco elevado de uma ou mais CDRs do anticorpo murino MC3 da Figura 15, e preferencialmente compreendendo resíduos de risco elevado de duas ou mais, ou três ou mais, ou quatro ou mais, ou cinco ou mais, ou todas as seis CDRs;

6) Anticorpos Human Engineered™ ou variantes retendo os resíduos de aminoácidos de elevado risco do anticorpo murino MC3, e compreendendo uma ou mais modificações nos resíduos de risco baixo ou moderado;

por exemplo, compreendendo um ou mais modificações num resíduo de risco baixo e substituições conservativas num moderado risco, ou

por exemplo, retendo os resíduos de aminoácido de risco moderado e elevado e compreendendo um ou mais modificações num resíduo de risco baixo,

em que modificações incluem inserções, eliminações ou substituições que podem ser substituições conservativas ou podem causar que o anticorpo modificado (*engineered*) seja mais próximo na sequência a uma sequência de cadeia leve ou cadeia pesada humana, uma sequência de cadeia leve ou cadeia pesada de linha germinal humana, uma sequência de

cadeia leve ou cadeia pesada humana consenso, ou uma sequência de cadeia leve ou cadeia pesada de linha germinal humana consenso;

que retêm a capacidade de se ligar a M-CSF. Tais anticorpos ligam-se preferencialmente a M-CSF com uma afinidade de pelo menos 10^{-7} , 10^{-8} ou 10^{-9} ou superior e preferencialmente neutralizam a atividade indutora de osteoclastogênese de M-CSF.

O termo "anticorpo derivado de 5H4" ou "anticorpo derivado de MC1" é definido similarmente de acordo com descrição acima.

Tal como aqui descrito em detalhe, anticorpos derivados de RX1, 5H4, MC1 ou MC3, incluindo anticorpos Human Engineered™ ou variantes, podem ser de diferentes isotipos, tais como IgG, IgA, IgM ou IgE. Anticorpos da classe IgG podem incluir uma região constante diferente, e.g. um anticorpo IgG2 pode ser modificado para apresentar uma região constante IgG1 ou IgG4. Anticorpos Human Engineered™ ou variantes compreendendo uma região constante IgG1 ou IgG4 modificada ou não modificada são aqui divulgados. No caso de IgG1, modificações na região constante, particularmente a região dobradiça ou CH2, pode aumentar ou diminuir a função efetora, incluindo a atividade ADCC e/ou CDC. Uma região constante IgG2 pode ser modificada para diminuir a formação do agregado anticorpo-antígeno. No caso de IgG4, modificações na região constante, particularmente a região dobradiça, pode reduzir a formação de meios-anticorpos. Num exemplo específico, a mutação da sequência da dobradiça de IgG4 Cys-Pro-Ser-Cys para a sequência da dobradiça de IgG 1 Cys-Pro-Pro-Cys é divulgada.

Anticorpos Human Engineered™ contendo regiões constantes IgG1 ou IgG4 são aqui mostrados como tendo propriedades melhoradas em comparação com anticorpos Human Engineered™ contendo IgG2 regiões constantes. A seleção da região Fc de IgG1 ou IgG4 melhorou a afinidade de ligação, a atividade de neutralização de MCSF, e a atividade anti-osteoclástica. Adicionalmente, a seleção da região Fc de IgG1 ou IgG4 região forneceu complexos antígeno-anticorpo que se assemelham proximamente aqueles formados pelo anticorpo murino parental.

A mobilidade na região dobradiça aparenta assim afetar, marcadamente, ligação do anticorpo ao antígeno dimérico MCSF bem como a atividade de neutralização do anticorpo. É contemplado que a preparação de anticorpos contendo uma cadeia pesada compreendendo uma região constante IgG1 ou IgG4 modificada ou não modificada, particularmente os domínios dobradiça e CH2, ou preferencialmente pelo menos os domínios dobradiça, melhora a afinidade de ligação e/ou uma desassociação lenta do anticorpo dos antígenos diméricos.

O termo "anticorpo competidor com RX1" inclui

- 1) um anticorpo monoclonal não murino ou não roedor que se liga ao mesmo epítipo de M-CSF como o RX1 murino tendo as sequências de cadeia leve e pesada completas definidas na Figura 4;
- 2) um anticorpo monoclonal não murino ou não roedor que se liga a pelo menos 4 aminoácidos contíguos dos aminoácidos 98-105 de M-CSF na Figura 12; e
- 3) um anticorpo não murino ou não roedor competidor com o anticorpo murino RX1 tendo a sequência completa definida na

Figura 4 para ligação a M-CSF, em mais de 75%, mais de 80%, ou mais de 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94% ou 95%. Tais anticorpos preferencialmente ligam-se a MCSF com uma afinidade de pelo menos 10^{-7} , 10^{-8} ou 10^{-9} ou superior e preferencialmente neutralizam a atividade indutora da osteoclastogênese de M-CSF.

O termo "anticorpo competidor com MC1" ou "anticorpo competidor com MC3" ou "anticorpo competidor com 5H4" é definido similarmente com respeito aos anticorpos murinos 5H4, MC1 ou MC3 tendo as sequências completas de cadeia leve e pesada definidas na Figura 13, 14 ou 15, respectivamente, e com referência ao epítipo de M-CSF ligado pelo anticorpo, e.g. aminoácidos 65-73 ou 138-144 da Figura 12 (correspondentes ao epítipo de M-CSFs reconhecido por 5H4 ou MC3).

Opcionalmente, qualquer anticorpo de M-CSF quimérico, humano ou humanizado publicamente divulgado antes desta data de submissão, ou divulgado num pedido de patente submetido antes desta data de submissão, está excluído do âmbito da invenção.

Anticorpo monoclonal "não roedor" é qualquer anticorpo, tal como amplamente definido aqui, que não seja um anticorpo monoclonal completo intacto de roedor gerado por um hibridoma de roedor. Assim, anticorpos não roedor incluem especificamente, não estando limitados a, variantes anticorpos de roedor, fragmentos de anticorpo de roedor, anticorpos lineares, anticorpos quiméricos, anticorpos humanizados, anticorpos Human Engineered™ e humanos, incluindo anticorpos humanos produzidos por animais transgênicos ou via tecnologia de exibição de fagos (tecnologia de *phage display*). Similarmente, anticorpos não

murinos incluem, não estando limitados a, variantes de anticorpos murinos, fragmentos de anticorpos murinos, anticorpos lineares, anticorpos quiméricos, humanizados, Human Engineered™ e humanos.

“Tumor”, tal como usado aqui, refere-se a todos os crescimentos e proliferações de células neoplásicas, quer sejam malignas ou benignas, e todas as células e tecidos pré-cancerosos e cancerosos.

Os termos “cancro” e “canceroso” referem-se a ou descrevem a condição fisiológica em mamíferos que é tipicamente caracterizada por crescimento celular não regulado. Exemplos de cancro incluem, não estando limitados a, carcinoma, linfoma, blastoma, sarcoma, e leucemia. Exemplos mais particulares desses cancros incluem cancro da mama, cancro da próstata, cancro do cólon, cancro das células escamosas, cancro do pulmão das pequenas células, cancro do pulmão das não pequenas células, cancro gastrointestinal, cancro pancreático, glioblastoma, cancro cervical, cancro do ovário, cancro do fígado, cancro da bexiga, hepatoma, cancro colo-rectal, carcinoma endometrial, carcinoma das glândulas salivares, cancro do rim, cancro do fígado, cancro vulval, cancro da tiroide, carcinoma hepático e vários tipos de cancro da cabeça e pescoço.

“Tratamento” é uma intervenção realizada com a intenção de prevenir o desenvolvimento ou alterar a patologia de uma desordem. De uma forma concordante, “tratamento” refere-se tanto ao tratamento terapêutico como profilático ou medidas preventivas. Aqueles que necessitam de tratamento incluem aqueles que já têm a desordem bem como aqueles em que a desordem deve ser prevenida. No tratamento de um tumor (e.g., cancro), um agente terapêutico pode diminuir diretamente a patologia das células tumorais, ou tornar as

células tumorais mais suscetíveis ao tratamento por outros agentes terapêuticos, e.g., radio e/ou quimioterapia. Tratamento de doentes que sofrem de sintomas clínicos, bioquímicos, radiológicos ou subjetivos da doença, tais como osteólise, pode incluir aliviar um ou todos os sintomas ou reduzir a predisposição para a doença. A "patologia" do cancro inclui todos os fenómenos que comprometem o bem-estar do doente. Isto inclui, sem limitação, crescimento celular anormal ou incontrolável, metástases, interferência com o normal funcionamento das células da vizinhança, libertação de citocinas ou outros produtos de secreção em níveis anormais, supressão ou agravamento da resposta inflamatória ou imunológica, etc. Assim, o melhoramento após o tratamento pode ser manifestado como um tamanho menor do tumor, diminuição da taxa de crescimento do tumor, destruição de células tumorais existentes ou células metastáticas, e/ou a redução no tamanho ou no número de metástases.

"Mamífero", para o objetivo do tratamento, refere-se qualquer animal classificado como um mamífero, incluindo humanos, animais domésticos e da quinta, e zoo, desportos, ou animais de estimação, tais como cães, cavalos, gatos, vacas, etc. Preferencialmente, o mamífero é um humano.

Tal como usada aqui, a frase "cancro metastático" é definida como cancros que têm potencial para se alastrarem a outras áreas do corpo, particularmente o osso. Uma variedade de cancros podem metastizar para o osso, mas os cancros metastizantes mais comuns são are mama, pulmão, renal, mieloma múltiplo, tireoide e próstata. A título de exemplo, outros cancros que têm o potencial para metastizar para o osso incluem, não estando limitados a, adenocarcinoma, malignidades das células sanguíneas, incluindo leucemia e linfoma; cancros da cabeça e pescoço;

cancros gastrointestinais, incluindo cancro esofágico, cancro do estômago, cancro do cólon, cancro intestinal, cancro colo-retal, cancro retal, cancro do pâncreas, cancro do fígado, cancro do ducto biliar ou da vesícula biliar; malignidades do trato genital feminino, incluindo carcinoma do ovário, cancros endometriais uterinos, cancro vaginal, e cancro cervical; cancro da bexiga; cancro do cérebro, incluindo neuroblastoma; sarcoma, osteossarcoma; e cancro da pele, incluindo melanoma maligno ou cancro das células escamosas. A presente divulgação contempla especialmente a prevenção e tratamento de lesões osteolíticas no osso induzidas por tumores.

Tal como usada aqui, a frase "quantidade terapeuticamente eficaz" refere-se a uma quantidade de anticorpo de M-CSF terapêutico ou profilático que seria apropriado, que irá gerar o efeito ou resposta terapêutica ou profilática quando administrado de acordo com o regime de tratamento desejado.

O "M-CSF" humano tal como usado aqui refere-se a um polipéptido humano tendo substancialmente a mesma sequência de aminoácidos que os polipéptidos humanos maduros M-CSF α , M-CSF β , ou M-CSF γ descritos em Kawasaki et al., Science 230:291 (1985), Cerretti et al., Molecular Immunology, 25:761 (1988), ou Ladner et al., EMBO Journal 6:2693 (1987). Tal terminologia reflete o entendimento de que os três M-CSFs maduros têm diferentes sequências de aminoácidos, tal como descrito acima, e que a forma ativa de M-CSF dímero ligado por ligações dissulfeto; assim, quando o termo "M-CSF" se refere à forma biologicamente ativa, pretende-se a forma dimérica. "Dímero M-CSF" refere-se a dois monómeros do polipéptido M-CSF que dimerizaram e inclui tanto os homodímeros (consistindo em dois monómeros

de M-CSF do mesmo tipo) como os heterodímeros (consistindo em dois monómeros diferentes). Os monómeros M-CSF podem ser convertidos em dímeros M-CSF in vitro tal como descrito na Pat. U.S. No. 4 929 700.

Anticorpos anti-MCSF

A presente divulgação inclui um anticorpo específico para M-CSF, tal como RX1, 5H4, MC1, e/ou MC3, formulações farmacêuticas incluindo um anticorpo específico para M-CSF, tal como RX1, 5H4, MC1, e/ou MC3, métodos de preparação das formulações farmacêuticas, e métodos de tratamento de doentes com as formulações farmacêuticas e compostos. O termo "anticorpo" é usado no sentido e incluído mais alargado e inclui anticorpos completamente montados, anticorpos monoclonais, anticorpos policlonais, anticorpos multiespecíficos (e.g., anticorpos biespecíficos), fragmentos de anticorpo que se conseguem ligar ao antigénio (e.g., Fab', F'(ab)₂, Fv, anticorpos de cadeia simples, diacorpos), e péptidos recombinantes compreendendo os acima expostos desde que exibam a atividade biológica desejada.

O termo "anticorpo monoclonal" tal como usado aqui refere-se a um anticorpo obtido de uma população de anticorpos substancialmente homogêneos, i.e., os anticorpos individuais compreendidos na população são idênticos excetuando nas mutações que podem ocorrer naturalmente que podem estar presentes em quantidades menores. Os anticorpos monoclonais são altamente específicos, sendo dirigidos contra um único sítio antigénico. Adicionalmente, ao contrário das preparações de anticorpos convencionais (policlonais) que tipicamente incluem anticorpos diferentes dirigidos contra diferentes determinantes (epítomos), cada anticorpo monoclonal é dirigido contra um único

determinante no antigénio. Para além da sua especificidade, os anticorpos monoclonais são vantajosos no sentido em que são sintetizados através da cultura homogénea, não contaminada por outras imunoglobulinas com diferentes especificidades e características.

O modificador "monoclonal" indica o carácter do anticorpo de ser obtido através de uma população substancialmente homogénea de anticorpos, e não deve ser interpretado como necessitando da produção do anticorpo por nenhum método em particular. Por exemplo, os anticorpos monoclonais a serem usados de acordo com a presente divulgação podem ser feitos pelo método do hibridoma primeiramente descrito por Kohler et al., *Nature*, 256:495 [1975], ou podem ser feitos através de métodos de DNA recombinante (ver, e.g., Patente U.S. No. 4.816.567). Os "anticorpos monoclonais" podem também ser isolados a partir de bibliotecas de anticorpos de fagos usando as técnicas descritas em Clackson et al., *Nature*, 352:624628 [1991] e Marks et al., *J. Mol. Biol.*, 222:581-597 (1991), por exemplo.

Dependendo da sequência de aminoácidos do domínio constante das suas cadeias pesadas, as imunoglobulinas podem ser atribuídas a diferentes classes. Existem cinco classes principais, IgA, IgD, IgE, IgG e IgM, e várias destas podem ser por sua vez divididas em subclasses ou isotipos, e.g. IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 e IgA2. Os domínios constantes de cadeia pesada correspondem às diferentes classes de imunoglobulinas que são designadas alfa, delta, epsilon, gamma e mu respetivamente. As estruturas de subunidade e as configurações tridimensionais das diferentes classes de imunoglobulinas são bem conhecidas. Diferentes isotipos têm funções efetoras diferentes; por exemplo, os isotipos IgG1 e IgG3 têm atividade ADCC.

Os "fragmentos de anticorpo" compreendem uma porção de um anticorpo intacto, na sua sequência completa, preferencialmente a região de ligação ao antigénio ou a região variável do anticorpo intacto. Exemplos de fragmentos de anticorpo incluem fragmentos Fab, Fab', F(ab')₂, e Fv; diacorpos; anticorpos lineares (Zapata et al., *Protein Eng.*, 8(10):1057-1062 (1995)); moléculas de anticorpo de cadeia simples; e anticorpos multiespecíficos formados a partir de fragmentos de anticorpo. A digestão por papaína de anticorpos produz dois fragmentos de ligação ao antigénio idênticos, designados fragmentos "Fab", cada um com um único sítio de ligação ao antigénio, e um fragmento residual "Fc", cujo nome reflete a sua capacidade de cristalizar prontamente 35. O tratamento com pepsina gera um fragmento F(ab')₂ que tem dois "Fv de cadeia simples" ou "sFv" fragmentos de anticorpo que compreendem os domínios VH e VL do anticorpo, em que estes domínios estão presentes numa única cadeia polipeptídica. Preferencialmente, o polipéptido Fv compreende adicionalmente um ligante de polipeptídico entre os domínios VH e VL que permitem que Fv forme a estrutura desejada para ligação ao antigénio. Para uma revisão sobre sFv, ver Pluckthun in *The Pharmacology of Monoclonal Antibodies*, vol. 113, Rosenberg and Moore eds., Springer-Verlag, New York, pp. 269-315 (1994).

O termo região "hipervariável" refere-se aos resíduos de aminoácidos de um anticorpo que são responsáveis pela ligação ao antigénio. A região hipervariável compreende resíduos de aminoácidos de uma região determinante da complementaridade ou CDR [i.e., resíduos 24-34 (L1), 50-56 (L2) e 89-97 (L3) no domínio variável da cadeia leve e 31-35 (H1), 50-65 (H2) e 95-102 (H3) no domínio variável da cadeia pesada tal como descrito por Kabat et al., *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5th Ed. Public

Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991)] e/ou aqueles resíduos de um *loop* hipervariável (*i.e.*, resíduos 26-32 (L1), 50-52 (L2) e 91-96 (L3) no domínio variável da cadeia leve e 26-32 (H1), 53-55 (H2) e 96-101 (H3) no domínio variável da cadeia pesada, tal como descrito por [Chothia et al., J. Mol.Biol. 196: 901-917 (1987)].

Resíduos "*framework*" ou FR são aqueles resíduos do domínio variável que não são resíduos da região hipervariável.

O termo "*diacorpos*" refere-se a pequenos fragmentos de anticorpo com dois locais de ligação a antigénio, fragmentos os quais compreendem um domínio variável da cadeia pesada (VH) ligado a um domínio variável da cadeia leve (VL) na mesma cadeia polipeptídica (VH VL). Usando um ligante que é demasiado pequeno para permitir o emparelhamento entre os dois domínios na mesma cadeia, os domínios são forçados a emparelhar com os domínios complementares de outra cadeia e criar dois locais de ligação ao antigénio. Os diacorpos são descritos de forma mais completa em, por exemplo, EP 404 097; WO 93/11161; e 30 Hollinger et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90:6444-6448 (1993).

Pode ser desejável gerar um anticorpo monoclonal multiespecífico (e.g. biespecífico) incluindo anticorpos monoclonais anti-M-CSF humanos, humanizados, Human Engineered™ ou variantes tendo especificidades de ligação para pelo menos dois epítomos diferentes. Anticorpos biespecíficos exemplificativos podem ligar-se a dois epítomos diferentes de M-CSF. Alternativamente, um braço anti-M-CSF pode ser combinado com um braço que se liga a uma molécula acionadora num leucócito tal como uma molécula

recetora de células T (e.g., CD2 ou CD3), ou recetores Fc para IgG (FcγR), tal como FcγRI (CD64), FcγRII (CD32) e FcγRIII (CD 16) de tal modo a focar mecanismos de defesa celular para a célula que expressa M-CSF. Anticorpos biespecíficos podem também ser usados para localizar agentes citotóxicos para células que expressam M-CSF. Estes anticorpos possuem um braço de ligação a M-CSF e um braço que se liga ao agente citotóxico (e.g., saporina, anti-interferão-60, alcaloides de vinca, cadeia A de ricina, metotrexato ou isótopo radioativo hapteno). Anticorpos biespecíficos podem ser preparados como anticorpos na sua sequência completa ou fragmentos de anticorpo (e.g., anticorpos biespecíficos F(ab')₂).

De acordo com outra abordagem para fazer anticorpos biespecíficos, a interface entre pares de moléculas de anticorpo pode ser modificado para maximizar a percentagem de heterodímeros que são recuperados da cultura celular recombinante. O a interface preferida compreende pelo menos uma parte do domínio CH3 de um domínio constante de um anticorpo. Neste método, uma ou mais pequenas cadeias laterais de aminoácidos da interface da primeira molécula de anticorpo são substituídos com cadeias laterais de maiores dimensões (e.g., tirosina ou triptofano). "Cavidades" compensatórias de tamanho idêntico ou similar às cadeias laterais de maiores dimensões são criados na interface da segunda molécula de anticorpo substituindo as cadeias laterais de aminoácidos de maiores dimensões com umas mais pequenas (e.g., alanina ou treonina). Isto fornece um mecanismo para aumentar o rendimento do heterodímero sobre outros produtos finais não desejados tais como homodímeros. Ver W096/27011 publicado a 6 Set., 1996.

Anticorpos biespecíficos incluem anticorpos ligados cruzadamente ou "heteroconjugados". Por exemplo, um dos anticorpos no heteroconjugado pode ser acoplado a avidina, o outro a biotina. Anticorpos heteroconjugados podem ser feitos usando quaisquer métodos convenientes de ligação cruzada (*crosslinking*). Agentes de ligação cruzada (*crosslinking*) adequados são bem conhecidos no estado da técnica e são divulgados na Pat. U.S. No. 4.676.980, bem como com um número de técnicas de ligação cruzada (*crosslinking*).

Técnicas para gerar anticorpos biespecíficos a partir de fragmentos de anticorpo foram também descritas na literatura. Por exemplo, anticorpos biespecíficos podem ser preparados usando ligação química. Brennan et al., Science 229:81 (1985) descrevem um procedimento em que anticorpos intactos são clivados proteoliticamente para gerar fragmentos F(ab')₂. Estes fragmentos são reduzidos na presença de um agente complexante de ditiol arsenite de sódio para estabilizar ditióis na vizinhança impedir a formação de ligações dissulfeto intermoleculares. Os fragmentos Fab' gerados são então convertidos em derivados de tionitrobenzoato (TNB). Um dos derivados de Fab'-TNB é então reconvertido para o Fab'-tiol por redução com mercaptoetilamina e é misturado com uma quantidade equimolar do outro derivado de Fab'-TNB para formar o anticorpo biespecífico. Os anticorpos biespecíficos produzidos podem ser usados como agentes para a imobilização seletiva de enzimas. Fragmentos Fab'-SH diretamente recuperados a partir de E. coli podem ser acoplados quimicamente in vitro para formar anticorpos biespecíficos. (Shalaby et al., J. Exp. Med. 175:217-225 (1992))

Shalaby et al., J. Exp. Med. 175:217-225 (1992) descrevem a produção de uma molécula de anticorpo biespecífico F(ab')₂ completamente humanizado. Cada fragmento Fab' foi secretado separadamente de *E.coli* e submetido a acoplamento químico dirigido *in vitro* para formar o anticorpo biespecífico. O anticorpo biespecífico assim formado foi capaz de se ligar a células que sobreexpressam o recetor HER2 e células T humanas normal, bem como a desencadear a atividade lítica de linfócitos citotóxicos humanos contra alvos de tumores humanos da mama.

Várias técnicas para fabricar e isolar fragmentos de anticorpos biespecíficos diretamente a partir de uma cultura celular recombinante têm também sido descritas. Por exemplo, anticorpos biespecíficos foram produzidos usando *zippers* de leucina. (Kostelny et al., J. Immunol. 148(5):1547-1553 (1992)) Os péptidos *zipper* de leucina das proteínas Fos e Jun foram ligados às porções Fab' de dois anticorpos diferentes através de fusão genética. Os homodímeros do anticorpo foram reduzidos na região dobradiça para formar monómeros e então re-oxidados para formar os heterodímeros de anticorpo. Este método pode também ser utilizado para a produção de homodímeros de anticorpo. A tecnologia "diacorpo" descrita por Hollinger et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:6444-6448 (1993) forneceu um mecanismo alternativo para produzir fragmentos de anticorpos biespecíficos

Os fragmentos compreendem uma região variável da cadeia pesada (V_H) ligada a uma região variável da cadeia leve (V_L) por um ligante que é demasiado pequeno para permitir o emparelhamento entre os dois domínios na mesma cadeia. De uma forma concordante, os domínios V_H e V_L de um fragmento são forçados a emparelhar com os domínios

complementares VL e VH de outro fragmento, formando assim dois locais de ligação a antigénio. Outra estratégia para produzir fragmentos de anticorpo biespecíficos pelo uso de Fv de cadeia simples (sFv) foi também reportada. Ver Gruber et al., J. Immunol. 152: 5368 (1994).

Alternativamente, o anticorpo biespecífico pode ser um "anticorpo linear" produzido tal como descrito em Zapata et al. Protein Eng. 8(10):1057-1062 (1995). Resumidamente, estes anticorpos compreendem um par de segmentos tandem Fd ($V_H - C_{H1} - V_H - C_{H1}$) que formam um par de regiões de ligação ao antigénio. Os anticorpos lineares podem ser biespecíficos ou monoespecíficos.

Anticorpos com mais de duas valências são também contemplados. Por exemplo, podem ser preparados anticorpos triespecíficos. (Tutt et al., J. Immunol. 147:60 (1991))

O anticorpo anti-M-CSF monoclonal, humano, humanizado, Human Engineered™ ou variante pode ser um fragmento de anticorpo, tal como um fragmento de anticorpo de RX1, 5H4, MC1, ou MC3. Várias técnicas foram desenvolvidas para a produção de fragmentos de anticorpo. Tradicionalmente, estes fragmentos foram derivados via digestão proteolítica de anticorpos intactos (ver, e.g., Morimoto et al., Journal of Biochemical and Biophysical Methods 24:107-117 (1992) e Brennan et al., Science 229:81 (1985)). No entanto, estes fragmentos podem agora ser produzidos diretamente através de células hospedeiras recombinantes. Better et al., Science 240: 1041-1043 (1988) divulgam a secreção de fragmentos de anticorpo funcionais a partir de bactérias (ver, e.g., Better et al., Skerra et al. Science 240: 1038-1041 (1988)). Por exemplo, fragmentos Fab'-SH podem ser diretamente recuperados a partir de E. coli e acoplados quimicamente para formar fragmentos F(ab')₂ (Carter et al.,

Bio/Technology 10:163-167 (1992)). O F(ab')₂ pode ser formado usando o zipper de leucina GCN4 para promover a construção da molécula F(ab')₂. De acordo com outra abordagem, fragmentos Fv, Fab ou F(ab')₂ podem ser isolados diretamente a partir de uma cultura celular recombinante. Outras técnicas para a produção de fragmentos de anticorpo serão evidentes para um perito na especialidade.

Um anticorpo "isolado" é aquele que foi identificado e separado e recuperado a partir de um componente do seu ambiente natural. Componentes contaminantes do seu ambiente natural são materiais que iriam interferir com usos diagnósticos ou terapêutico para o anticorpo, e podem incluir enzimas, hormonas, e outros solutos proteínáceos ou não proteínáceos. O anticorpo pode ser purificado (1) a mais de 95% em peso de anticorpo tal como determinado pelo método Lowry, e mais preferencialmente mais de 99% em peso, (2) até um grau suficiente para obter pelo menos 15 resíduos de sequência de aminoácidos N-terminal ou interna pelo uso sequenciador de copo giratório (*spinning cup*), ou (3) até à homogeneidade através de SDS-PAGE sob condições redutoras ou não redutoras usando azul de Coomassie ou, preferencialmente, coloração por prata (*silver stain*). Anticorpo isolado inclui o anticorpo *in situ* com células recombinantes desde que pelo menos um componente do ambiente natural do anticorpo não esteja presente. Normalmente, no entanto, o anticorpo isolado irá ser preparado através de pelo menos um passo de purificação.

Para uma descrição detalhada da estrutura e geração de anticorpos, ver Roth, D.B., e Craig, N.L., Cell, 94:411-414 (1998), e Patente dos Estados Unidos No. 6 255 458. Resumidamente, o processo para gerar DNA que codifica genes da cadeia pesada e cadeia leve de imunoglobulina ocorre

primariamente em células B em desenvolvimento. Previamente ao rearranjo e junção de vários segmentos de genes de imunoglobulina, os segmentos de genes V, D, J e constante (C) são encontrados geralmente numa proximidade relativamente próxima num único cromossoma. Durante a diferenciação de células B, um de cada um dos membros da família adequados dos segmentos de genes V, D, J (ou apenas V e J no caso de genes de cadeia leve) são recombinados para formar genes de imunoglobulina leves e pesados rearranjados funcionalmente. Este processo de rearranjo de segmentos de genes aparenta ser sequencial. Primeiro, as junções de cadeia pesada D-para-J são feitas, seguidas de junções de cadeia pesada V-para-DJ e junções de cadeia leve V-para-J.

A recombinação dos segmentos de genes da região variável para formar regiões variáveis funcionais da cadeia pesada e leve é mediado por sequências de sinal de recombinação (RSSs) que flanqueiam segmentos V, D e J competentes de forma recombinante. Os RSSs necessários e suficientes para dirigir a recombinação compreendem um heptâmero simétrico em díade, um nonâmero rico em AT e uma região espaçadora interveniente de ou 12 ou 23 pares de bases. Estes sinais são conservados entre os diferentes locais e espécies que realizam a recombinação D-J (ou V-J) são funcionalmente intermutáveis. Ver Oettinger, et al. (1990), *Science*, 248, 1517-1523 e referências aí citadas. O heptâmero compreende a sequência CACAGTG ou análoga da mesma seguida de uma sequência espaçadora não conservada e em seguida um nonâmero tendo a sequência ACAAAAACC ou análoga da mesma. Estas sequências são encontradas no lado J, ou a jusante, de cada um dos segmentos de genes V e D. Imediatamente precedendo os segmentos de linha germinal D e J estão novamente duas sequências de sinal de recombinação, primeiro o nonâmero e em seguida o heptâmero novamente

separados por uma sequência não conservada. AS sequências heptamérica e nonamérica que se seguem a um segmento V_L , V_H ou D são complementares àquelas que precedem os segmentos J_L , D ou J_H com os quais recombina. Os espaçadores entre as sequências heptamérica e nonamérica têm ou 12 pares de bases de comprimento ou entre 22 e 24 pares de bases de comprimento.

Adicionalmente ao rearranjo dos segmentos V , D e J , maior diversidade é gerada no primeiro reportório de cadeia pesada e leve de imunoglobulina por meio de recombinação variável nas localizações onde os segmentos V e J na cadeia leve se juntam e onde os segmentos D e J da cadeia pesada se juntam. Tal variação na cadeia leve ocorre tipicamente dentro do último codão do segmento de gene V o primeiro codão do segmento J . Uma imprecisão similar na junção ocorre no cromossoma da cadeia pesada entre os segmentos D e J_H se pode estender-se ao longo de até 10 nucleótidos. Adicionalmente, vários nucleótidos podem ser inseridos entre os segmentos de genes D e J_H e entre os segmentos de genes V_H e D gene que não são codificados por DNA gnómico. A adição destes nucleótidos é conhecida como a diversidade da região N .

O efeito líquido de tais rearranjos nos segmentos de genes da região variável e a recombinação variável que pode ocorrer durante tal junção é a produção de um reportório de anticorpos primários.

"Fv" é o fragmento de anticorpo mínimo que contém um local de reconhecimento e ligação do antigénio. Esta região consiste num dímero de um domínio variável de cadeia pesada e um de cadeia leve em associação próxima e não covalente. É nesta configuração que as três CDRs de cada domínio variável interagem para definir um local de ligação ao

antigénio na superfície do dímero VH VI. Coletivamente, as seis CDRs conferem especificidade de ligação ao antigénio ao anticorpo. No entanto, até um domínio variável único (ou metade de um Fv compreendendo apenas três CDRs específicas para um antigénio) tem a capacidade de reconhecer e ligar-se ao antigénio, embora com uma afinidade mais baixa do que o local de ligação inteiro.

O fragmento Fab também contém o domínio constante da cadeia leve e o primeiro domínio constante (CH1) da cadeia pesada. Os fragmentos Fab diferem dos fragmentos Fab' fragmentos pela adição de alguns resíduos no terminal carboxi do domínio CH1 da cadeia pesada incluindo um ou mais cisteínas da região dobradiça do anticorpo. Fab'-SH é a designação aqui para Fab' em que os resíduo(s) cisteína dos domínios constantes carregam um grupo tiol livre. Fragmentos de anticorpo F(ab')₂ foram produzidos originalmente como pares de fragmentos Fab' que têm cisteína dobradiça entre eles.

Por "anticorpo neutralizante" entende-se uma molécula de anticorpo que tem a capacidade de eliminar ou reduzir significativamente uma função efetora de um antigénio alvo ao qual se liga. De uma forma concordante, um anticorpo "neutralizante" anti-alvo tem a capacidade de eliminar ou reduzir significativamente uma função efetora, tal como atividade enzimática, ligação de ligando, ou sinalização intracelular.

As composições para e os métodos de tratar metástases de cancro e/ou perda óssea associada às metástases de cancro podem utilizar um ou mais anticorpos usados de forma singular ou em combinação com outros agentes terapêuticos para atingir os efeitos desejados. Anticorpos de acordo com a presente divulgação podem ser isolados a partir de um animal que produz o anticorpo como resultado de ou contacto

direto com um antígeno ambiental ou imunização com o antígeno. Alternativamente, os anticorpos podem ser produzidos por metodologia de DNA recombinante usando um dos sistemas de expressão de anticorpos bem conhecidos no estado da técnica (ver, e.g., Harlow and Lane, *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory (1988)). Tais anticorpos podem incluir IgGs recombinantes, proteínas de fusão quiméricas tendo sequências derivadas de imunoglobulinas ou anticorpos "Human Engineered™" que podem ser usados para o tratamento de metástases de cancro e/ou perda óssea associada às metástases de cancro de acordo com a presente divulgação. Para além das moléculas intactas e na sua sequência completa, o termo "anticorpo" refere-se também a fragmentos do mesmo (tais como, e.g., fragmentos scFv, Fv, Fd, Fab, Fab' e F(ab)'₂) ou multímeros ou agregados de moléculas intactas e/ou fragmentos que se ligam a M-CSF (ou M-CSFR). Estes fragmentos de anticorpo ligam-se ao antígeno e podem ser derivatizados para exibir características estruturais que facilitam a eliminação e o consumo, e.g., por incorporação de resíduos de galactose.

Anticorpos monoclonais M-CSF podem ser preparados essencialmente tal como descrito em Halenbeck et al. Pat. U.S. No. 5.491.065 (1997). Anticorpos monoclonais de M-CSF exemplificativos incluem aqueles que se ligam a um epítipo conformacional aparente associado a M-CSF dimérico recombinante ou nativo com neutralização concomitante da atividade biológica. Estes anticorpos são substancialmente não reativos com formas biologicamente inativas de M-CSF incluindo o M-CSF monomérico e dimérico quimicamente derivatizado.

Anticorpos monoclonais anti-M-CSF Human Engineered™ são aqui divulgados. A frase "anticorpo Human Engineered™" refere-se a um anticorpo derivado de um anticorpo

nãohumano, tipicamente um anticorpo monoclonal de ratinho. Alternativamente, um anticorpo Human Engineered™ pode ser derivado de um anticorpo quimérico que retém ou substancialmente retém as propriedades de ligação ao antigénio do anticorpo parental, não humano, mas que exhibe uma imunogenicidade diminuída comparativamente ao anticorpo parental quando administrada a humanos. A frase "anticorpo quimérico" tal como usado aqui, refere-se a um anticorpo contendo uma sequência derivada de dois anticorpos diferentes (ver, e.g., Patente U.S. No. 4.816.567) que tipicamente se originam a partir de espécies diferentes. Mais tipicamente, anticorpos quiméricos compreendem fragmentos de anticorpo humano e murino, geralmente regiões constante e variáveis de ratinho.

A frase "região determinante de complementaridade" ou o termo "CDR" refere-se a sequências de aminoácidos que em conjunto definem a afinidade e especificidade de ligação da região Fv natural de um local de ligação ao antigénio de uma imunoglobulina nativa (ver, e.g., Chothia et al., J. Mol. Biol. 196:901-917 (1987); Kabat et al., Publicação No. 91-3242 do U.S. Dept. of Health e Human Services NIH (1991)). A frase "região constante" refere-se à porção da molécula de anticorpo que confere funções efetoras. Na presente divulgação, regiões constantes de ratinho são preferencialmente substituídas por regiões constantes humanas. As regiões constantes dos anticorpos são derivadas de imunoglobulinas humanas. A região constante da cadeia pesada pode ser selecionada de entre qualquer um dos cinco isotipos: alfa, delta, epsilon, gamma ou mu.

Os anticorpos da presente divulgação são referidos como sendo imuno-específicos ou ligando-se especificamente se se ligam ao antigénio com um K_a superior ou igual a cerca de $10^6 M^{-1}$ preferencialmente superior ou igual a cerca de $10^7 M^{-1}$.

¹, mais preferencialmente superior ou igual a cerca de $10^8 M^{-1}$, e o mais preferencialmente superior ou igual a cerca de $10^9 M^{-1}$, $10^{10} M^{-1}$, $10^{11} M^{-1}$ ou $10^{12} M^{-1}$. Os anticorpos anti-M-CSF podem ligar-se a diferentes formas que ocorrem naturalmente de M-CSF, incluindo aquelas expressas pelos tecidos do hospedeiro/indivíduo bem como aqueles expressos pelo tumor. Os anticorpos monoclonais aqui divulgados, tal como o anticorpo RX1, 5H4, MC1, ou MC3, têm afinidade para M-CSF e são caracterizados por uma constante de dissociação de equilíbrio (Kd) de pelo menos $10^{-4} M$, preferencialmente pelo menos cerca de $10^{-7} M$ a cerca de $10^{-8} M$, mais preferencialmente pelo menos cerca de $10^{-8} M$, $10^{-10} M$, $10^{-11} M$ ou $10^{-12} M$. Tais afinidades podem ser prontamente determinadas usando técnicas convencionais, tais como por diálise de equilíbrio; usando o instrumento BIAcore 2000, usando procedimentos gerais estabelecidos pelo fabricante; por radioimunoensaio com M-CSF marcado com ^{125}I ; ou por outro método conhecido para um perito na especialidade. Os dados de afinidade podem ser analisados, por exemplo, pelo método de Scatchard et al., Ann N.Y. Acad. Sci., 51:660 (1949). Assim, será evidente que os anticorpos de M-CSF irão exibir um elevado grau de especificidade para M-CSF e se irão ligar com uma afinidade substancialmente mais baixa a outras moléculas. Os anticorpos preferidos ligam-se a M-CSF com uma afinidade similar à do RX1 murino da Figura 4 de se ligar a M-CSF, exibem baixa imunogenicidade, e inibem metástases de células de cancro quando testados em modelos animais de doença metastática. Outros anticorpos exemplificativos ligam-se a M-CSF com uma afinidade similar à do 5H4, MC1 ou MC3 murino da Figura 13, 14 ou 15, respetivamente, de se ligar a M-CSF.

O antigénio a ser usado para a produção de anticorpos pode ser, e.g., M-CSF intacto ou um fragmento de M-CSF que retém o epítopo desejado, opcionalmente fundido com outro

polipéptido que permite que o epítopo seja apresentado na sua conformação nativa. Alternativamente, as células que expressam M-CSF na sua superfície celular podem ser usadas para gerar anticorpos. Tais células podem ser transformadas para expressar M-CSF ou podem ser outras células que ocorrem naturalmente e que expressam M-CSF. Outras formas de M-CSF úteis para gerar anticorpos serão evidentes para os peritos na especialidade.

Anticorpos Policlonais

Anticorpos policlonais são preferencialmente criados em animais através de múltiplas injeções subcutâneas (sc) ou intraperitoneais (ip) do antigénio relevante e um adjuvante. Um resposta melhorada de um anticorpo pode ser obtida conjugando o antigénio relevante com uma proteína que é imunogénica na espécie a ser imunizada, e.g., hemocianina da lapa californiana, albumina do soro, tiroglobulina bovina, ou inibidor de tripsina de soja usando um agente bifuncional ou derivatizante, por exemplo, éster de maleimidobenzoílo sulfosuccinimida (conjugação através de resíduos cisteína), N-hidroxisuccinimida (através de resíduos lisina), glutaraldeído, anidrido succínico ou outros agentes conhecidos no estado da técnica.

Os animais são imunizados contra o antigénio, conjugados imunogénicos, ou derivados, combinando e.g., 100 µg ou 5 µg da proteína ou conjugado (para coelhos ou ratinhos, respetivamente) com 3 volumes de adjuvante completo de Freund e injetando a solução intradermicamente em múltiplos sítios. Um mês depois, os animais recebem um reforço de 1/5 para (fração (1/10)) a quantidade original de péptido ou conjugado em adjuvante completo de Freund através de

injeção subcutânea em múltiplos sítios. Nos 7-14 dias após a injeção de reforço, os animais são sangrados e o soro é analisado quanto ao título de anticorpo. Os animais recebem reforço até o título estabilizar (*plateau*). Preferencialmente, o animal recebe reforço com o conjugado do mesmo antigénio, mas conjugado um uma proteína diferente e/ou através de um reagente de ligação cruzada diferente. Os conjugados também podem ser feitos em cultura celular recombinante com fusões de proteínas. Adicionalmente, agentes agregadores tais como alume são usados de forma adequada para acentuar a resposta imunitária.

Anticorpos monoclonais

Os anticorpos monoclonais podem ser feitos usando o método do hibridoma primeiramente descrito por Kohler et al., *Nature*, 256:495 (1975), ou podem ser feitos através de métodos de DNA recombinante.

No método do hibridoma, um ratinho outro animal hospedeiro apropriado, tal como um hamster ou macaco, é imunizado tal como aqui descrito para incitar linfócitos que produzem ou têm a capacidade de produzir anticorpos que se irão ligar especificamente à proteína usada para a imunização. Alternativamente, os linfócitos podem ser imunizados *in vitro*. Os linfócitos são então fundidos com células de mieloma usando um agente de fusão adequado, tal como polietileno glicol, para formar uma célula de hibridoma (Goding, *Monoclonal antibodies: Principles and Practice*, pp.59-103 (Academic Press, 1986)).

As células de hibridoma assim preparadas são inoculadas num meio de cultura adequado que preferencialmente contém uma ou mais substâncias que inibem o crescimento ou

sobrevivência do que as células de mieloma não fundidas parentais. Por exemplo, se as células de mieloma parentais são desprovidas da enzima hipoxantina guanina fosforibosil transferase (HGPRT ou HPRT), o meio de cultura para os hibridomas tipicamente irá incluir hipoxantina, aminopterina, e timidina (meio HAT), substâncias que previnem o crescimento de células deficientes em HGPRT.

Células de mieloma preferidas são aquelas que se fundem eficientemente, suportam uma produção de anticorpo num nível elevado estável de anticorpo pelas células produtoras de anticorpo selecionadas, e são sensíveis a um meio. Linhas celulares de mieloma humano e heteromieloma ratinho-humano também têm sido descritas para a produção de anticorpos monoclonais humanos (Kozbor, J. *Imunol.*, 133: 3001 (1984); Brodeur et al., *Monoclonal antibody Production Techniques and Applications*, pp. 51-63 (Marcel Dekker, Inc., New York, 1987)). Linhas de mieloma murino incluem aquelas derivadas de tumores MOP-21 e M.C.-11 de ratinho disponíveis no Salk Institute Cell Distribution Center, San Diego, Calif. EUA, e células SP-2 ou X63-Ag8-653 disponíveis na American Type Culture Collection, Rockville, Md. EUA.

O meio de cultura em que as células de hibridoma crescem é analisado quanto à produção de anticorpos monoclonais dirigidos contra o antigénio. Preferencialmente, a especificidade de ligação de anticorpos monoclonais produzidos por células de hibridoma é determinada por imunoprecipitação ou um ensaio de ligação *in vitro*, tal como radioensaio (RIA) ou ensaio imunoabsorvente ligado a enzima (ELISA). A afinidade de ligação do anticorpo monoclonal pode, por exemplo, ser determinada por análise Scatchard (Munson et al., *Anal. Biochem.*, 107:220 (1980)).

Após as células de hibridoma serem identificadas como produzindo anticorpos da especificidade, afinidade, e/ou atividade desejada, os clones podem ser subclonados através da procedimentos de diluição limitada e cultivados por métodos padrão (Goding, *Monoclonal antibodies: Principles and Practice*, pp.59-103 (Academic Press, 1986)). O meio de cultura adequado para este objetivo inclui, por exemplo, meio D-MEM ou RPMI-1640. Adicionalmente, as células de hibridoma podem ser cultivadas *in vivo* como tumores de ascites num animal. Os anticorpos monoclonais secretados pelos subclones são separados de forma adequada do meio de cultura, fluido de ascites, ou soro por procedimentos convencionais de purificação de imunoglobulinas tais como, por exemplo, sefarose de proteína A, cromatografia hidroxilapatite, eletroforese em gel, diálise, ou cromatografia de afinidade.

Produção Recombinante de Anticorpos

O DNA que codifica anticorpos monoclonais pode ser isolado e sequenciado a partir das células de hibridoma usando procedimentos convencionais (e.g., usando sondas de oligonucleótidos que têm a capacidade de se ligarem especificamente a genes que codificam as cadeias pesada e leve dos anticorpos monoclonais). A determinação da sequência irá geralmente necessitar do isolamento de pelo menos uma porção do gene ou cDNA de interesse. Usualmente, isto requer clonagem de DNA ou, preferencialmente, mRNA (i.e., cDNA) codificando os anticorpos monoclonais. A clonagem é realizada usando técnicas padrão (ver, e.g., Sambrook et al. (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Guide*, Vols 1-3, Cold Spring Harbor Press). Por exemplo, uma biblioteca de cDNA pode ser construída por transcrição

reversa de mRNA polyA+, preferencialmente mRNA associado à membrana, e a biblioteca rastreada usando sondas específicas para sequências de genes de polipéptidos de imunoglobulina humana. Preferencialmente, no entanto, a reação da polimerase em cadeia (PCR) é usada para amplificar cDNAs (ou porções dos cDNAs na sua sequência completa) que codificam um segmento de genes de imunoglobulina de interesse (e.g., um segmento variável de cadeia leve). As sequências amplificadas podem ser prontamente clonadas num qualquer vetor adequado, e.g., vetores de expressão, vetores minigene, ou vetores de exibição de fagos. Será apreciado que o método particular de clonagem usado não seja crítico, desde que seja possível determinar a sequência de alguma porção do polipéptido imunoglobulina de interesse. Tal como usado aqui, uma molécula de ácido nucleico "isolada" ou uma sequência de ácidos nucleicos "isolada" é uma molécula de ácido nucleico que é ou (1) identificada e separada de pelo menos uma molécula de ácido nucleico contaminante com a qual é vulgarmente associada na fonte natural do ácido nucleico ou (2) clonada, amplificada, marcada, ou distinguida de qualquer outra forma dos ácidos nucleicos de fundo de tal modo que a sequência do ácido nucleico de interesse possa ser determinada, é considerada isolada. Uma molécula de ácido nucleico isolado é uma que não esteja na forma ou configuração em que é encontrada na natureza. Moléculas isoladas de ácidos nucleicos são assim distinguidas das moléculas de ácidos nucleicos tal como existem nas células naturais. No entanto, uma molécula de ácido nucleico isolada inclui uma molécula de ácido nucleico contida em células que expressam vulgarmente o anticorpo onde, por exemplo, a molécula de ácido nucleico está numa localização cromossômica diferente daquela das células naturais.

Uma fonte para o RNA usado para clonagem e sequenciação é um hibridoma produzido obtendo uma célula B do ratinho transgênico fundindo a célula B com uma célula imortal. Uma vantagem da utilização de hibridomas é de que podem ser facilmente rastreados, e um hibridoma que produz um anticorpo monoclonal humano de interesse selecionado. Alternativamente, o RNA pode ser isolado das células B (ou baço completo) do animal imunizado. Quando são usadas outras fontes que não hibridomas, pode ser desejável rastrear sequências que codificam imunoglobulinas ou imunoglobulina polipéptidos com características de ligação específica. Um método para tal rastreio é o uso de tecnologia de exibição de fagos. A exibição de fagos é descrita em e.g., Dower et al., WO 91/17271, McCafferty et al., WO 92/01047, e Caton e Koprowski, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 87:6450-6454 (1990). Usando a tecnologia de exibição de fagos, cDNA de um ratinho transgênico isolado (e.g., cDNA total de baço) pode ser isolado, a reação da polimerase em cadeia pode ser usada para amplificar sequências de cDNA que codificam uma porção de um polipéptido de imunoglobulina, e.g., regiões CDR, e as sequências amplificadas são inseridas num vetor de fagos. Os cDNAs que codificam péptidos de interesse, e.g., péptidos da região variável com características de ligação desejadas, são identificados através de técnicas padrão como reconhecimento e seleção (*panning*).

A sequência do ácido nucleico amplificado ou clonado é então determinada. Tipicamente a sequência que codifica uma região variável inteira do polipéptido da imunoglobulina é determinado, no entanto, será por vezes adequado sequenciar apenas uma porção de uma região variável, por exemplo, a região codificante de CDR. Tipicamente a porção sequenciada terá pelo menos 30 bases de comprimento, mais frequentemente codificação baseada para pelo menos cerca de

um terço ou pelo menos cerca de metade do comprimento da região variável será sequenciado.

A sequenciação pode ser realizada em clones isolados a partir de uma biblioteca de cDNA, ou, quando é usado PCR, após a subclonagem da sequência amplificada ou por sequenciação PCR direta do segmento amplificado. A sequenciação é realizada usando técnicas padrão (ver, e.g., Sambrook et al. (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Guide*, Vols 1-3, Cold Spring Harbor Press, e Sanger, F. et al. (1977) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74: 5463-5467). Através da comparação da sequência do ácido nucleico clonado com sequências publicadas de genes e cDNAs de imunoglobulina humana, um perito na especialidade irá prontamente ser capaz de determinar, dependendo na região sequenciada, (i) o uso de segmento de linha germinal do polipéptido de imunoglobulina do hibridoma (incluindo o isotipo da cadeia pesada) e (ii) a sequência das regiões variáveis da cadeia pesada e leve, incluindo sequências resultantes da adição da região N e o processo de mutação somática. Uma fonte de informação sobre sequências de genes de imunoglobulina é o National Center for Biotechnology Information, National Library of Medicine, National Institutes of Health, Bethesda, Md.

Uma vez isolado, o DNA pode ser introduzido em vetores de expressão, que são então transfetados para células hospedeiras tal como células de *E. coli*, células de COS símio, células embrionárias de rim 293 (e.g., células 293E), células de ovário de hamster chinês (CHO), ou células de mieloma que não produzem proteína imunoglobulina, para obter a síntese de anticorpos monoclonais nas células hospedeiras recombinantes. A produção recombinante de anticorpos é bem conhecida no estado da técnica.

As sequências de controlo de expressão referem-se a sequências de DNA necessárias para a expressão de uma sequência codificante ligada operativamente num organismo hospedeiro em particular. As sequências de controlo que são adequadas para procariotas, por exemplo, incluem um promotor, opcionalmente uma sequência de operador, e um local de ligação do ribossoma. As células eucarióticas são conhecidas por usarem promotores, sinais de poliadenilação, e acentuadores.

O ácido nucleico está operativamente ligado quando é colocado numa relação funcional com outra sequência de ácidos nucleicos. Por exemplo, o DNA para uma pré-sequência ou líder de secreção está operativamente ligado ao DNA para um polipéptido se é expresso como uma pré-proteína que participa na secreção do polipéptido; um promotor ou acentuador está ligado operativamente a uma sequência codificante se afeta a transcrição da sequência; ou um local de ligação do ribossoma está ligado operativamente a uma sequência codificante se está posicionado de tal modo a facilitar a tradução. Geralmente, ligado operativamente significa que as sequências de DNA a ser ligadas são contíguas, e, no caso de um líder de secreção, contíguas e em fase de leitura. No entanto, os acentuadores não têm de ser contíguos. A ligação é realizada pela ligação em locais de restrição adequados. Se tais locais não existirem, os adaptadores de oligonucleótidos sintéticos ou ligantes são usados de acordo com práticas convencionais.

Célula, linha celular, e cultura celular são muitas vezes usados intermutavelmente e todas essas designações aqui incluem progenia. As células transformantes e transformadas incluindo a célula sujeito primária e culturas derivadas da mesma sem ter em conta o número de transferências. É também

entendido que toda a progenia pode não ser precisamente idêntica em conteúdo de DNA, devido a mutações deliberadas ou inadvertidas. Progenia mutante que tenha a mesma função ou atividade biológica tal como rastreada na célula transformada originalmente é incluída. Quando se pretenderem designações distintas, será claro a partir do contexto.

Uma sequência de aminoácidos de uma imunoglobulina de interesse pode ser determinada por sequenciação direta de proteínas. Sequências de nucleótidos codificantes adequadas podem ser desenhadas de acordo com uma tabela de códons universais.

Variantes de sequências de aminoácidos do anticorpo desejado podem ser preparadas pela introdução de modificações nucleótidos apropriadas no DNA codificante, ou por síntese peptídica. Tais variantes incluem, por exemplo, eliminações de, e/ou inserções em e/ou substituições de, resíduos dentro de sequências de aminoácidos dos anticorpos. Qualquer combinação de eliminação, inserção, e substituição é realizada para se chegar ao constructo final, desde que o construo final possua as características desejadas. As modificações de aminoácidos também podem alterar processos pós-translacionais o anticorpo monoclonal, humano, humanizado, Human Engineered™ ou variante, tal como alterar o número ou posição de locais de glicosilação.

Moléculas de ácido nucleico que codificam variantes de sequências de aminoácidos do anticorpo são preparadas por uma variedade de métodos conhecidos no estado da técnica. Estes métodos incluem, não estando limitados a, isolamento a partir de uma fonte natural (no caso de variantes de sequência de aminoácidos que ocorrem naturalmente) ou

preparação por mutagênese mediada por nucleótidos (ou dirigida a um local), mutagênese de PCR, e mutagênese de cassete de uma versão variante ou a non-variante do anticorpo preparada previamente.

Também divulgados aqui são ácidos nucleicos isolados codificando os anticorpos da divulgação, opcionalmente ligados operativamente para controlar sequências reconhecidas por uma célula hospedeira, vetores e células hospedeiras compreendendo os ácidos nucleicos, e técnicas recombinantes para a produção dos anticorpos, que podem compreender cultivar a célula hospedeira de tal modo que o ácido nucleico é expresso e, opcionalmente, recuperar o anticorpo da cultura de células hospedeiras ou meio de cultura.

Para a produção recombinante do anticorpo, o ácido nucleico que o codifica é isolado e inserido num vetor replicável para clonagem adicional (amplificação do DNA) ou para expressão. O DNA que codifica o anticorpo monoclonal é prontamente isolado e sequenciado usando procedimentos convencionais (e.g., usando sondas de oligonucleótidos que têm a capacidade de se ligarem especificamente a genes que codificam as cadeias pesada e leve do anticorpo). Muitos vetores estão disponíveis. Os componentes do vetor geralmente incluem, não estando limitados a, um ou mais dos seguintes: uma sequência de sinal, uma origem de replicação, um ou mais genes de marcação seletivos, um elemento acentuador, um promotor, e uma sequência terminadora da transcrição.

(1) Componente de sequência de sinal

O anticorpo da divulgação pode ser produzido de forma recombinante não só diretamente, mas também como um

polipéptido fundido com polipéptido heterólogos, que é preferencialmente uma sequência de sinal ou outro polipéptido com um local de clivagem específico no terminal N da proteína madura ou polipéptido. A sequência de sinal selecionada preferencialmente é uma que é reconhecida e processada (i.e., clivada por uma peptidase de sinal) pela célula hospedeira. Se as células hospedeiras procarióticas não reconhecerem e processarem a sequência de sinal nativa do anticorpo, a sequência de sinal pode ser substituída por uma sequência de sinal selecionada, por exemplo, do grupo de pectato liase (e.g., pelB), fosfatase alcalina, penicilinase, lpp, ou líderes enterotoxina II termoestável. Para a secreção em leveduras a sequência de sinal nativa pode ser substituída por, e.g., o líder invertase de levedura, líder fator α (incluindo líderes fator α de *Saccharomyces* e *Kluyveromyces*), ou líder fosfatase ácida, o líder glumamilase de *C. albicans*, ou o sinal descrito in WO90/13646. Na expressão das células de mamíferos, sequências sinal de mamíferos, bem como líderes de secreção virais, por exemplo, o sinal gD de herpes simplex, estão disponíveis.

O DNA para tal região precursora é ligado em grelha de leitura ao DNA que codifica o anticorpo.

(2) Componente de origem de replicação

Ambos os vetores de expressão e clonagem contêm uma sequência de ácidos nucleicos que permite que o vetor se replique em uma ou mais células hospedeiras selecionadas. Geralmente, em vetores de clonagem, esta sequência é uma que permite que o vetor se replique independentemente do DNA cromossômico do hospedeiro, e inclui origens de replicação ou sequências que se replicam autonomamente.

Tais sequências são bem conhecidas para uma variedade de bactérias, leveduras, e vírus. A origem de replicação do plasmídeo pBR322 é adequada para a maioria das bactérias Gram-negativas, a origem 2 m do plasmídeo é adequada para levedura, e várias origens virais são úteis para vetores de de origem de replicação não é necessário para vetores de expressão de mamíferos (apenas a origem SV40 pode tipicamente ser usada porque contém um promotor precoce).

(3) Componente de marcador seletivo

Vetores de expressão e de clonagem podem conter um gene seletivo, também denominado de marcador selecionável. Genes de eleição típicos codificam proteínas que (a) conferem resistência a antibióticos ou outras toxinas, e.g., ampicilina, neomicina, metotrexato, tetraciclina, G418, geneticina, histidinol, ou ácido micofenólico (b) complementam deficiências auxotróficas, ou (c) fornecem nutrientes críticos não disponíveis nos meios complexos, e.g., o gene que codifica a D-alanina racemase para *Bacilli*.

Um exemplo de um esquema de seleção utiliza um fármaco para impedir o desenvolvimento de uma célula hospedeira. Essas células que são transformadas com sucesso com um gene heterólogo produzem uma proteína que confere resistência a fármacos assim sobreviver ao regime de seleção. Exemplos de tal seleção dominante usam os fármacos metotrexato, neomicina, histidinol, puromicina, ácido micofenólico e higromicina.

Outro exemplo de marcadores selecionáveis adequados para células de mamíferos são aqueles que permitem a identificação de células competentes para prender o ácido nucleico que codifica o anticorpo, tal como DHFR, timidina

cinase, metalotioneína-I e -II, preferencialmente genes metalotioneína de primata, adenosina desaminase, ornitina decarboxilase, etc.

Por exemplo, células transformadas com o gene de seleção DHFR são primeiramente identificadas através da cultura de todos os transformantes num meio de cultura que contém metotrexato (Mtx), um antagonista competidor de DHFR. Uma célula hospedeira apropriada quando é utilizado o DHFR selvagem é a linha celular de ovário de hamster chinês (CHO) deficiente em atividade de DHFR.

Alternativamente, células hospedeiras (particularmente hospedeiros selvagens que contêm DHFR endógeno) transformadas ou co-transformadas com sequências de DNA que codificam o anticorpo da divulgação, proteína DHFR selvagem, e outro marcador selecionável tal como aminoglicósido 3'-fosfotransferase (APH) podem ser selecionadas pelo crescimento celular contendo um agente de seleção para o marcador selecionável tal como um antibiótico aminoglicosídico, e.g., canamicina, neomicina, ou G418. Ver Patente U.S. No. 4 965 199.

Um gene de seleção adequado para uso em levedura é o gene *trp1* presente no plasmídeo de levedura YRp7 (Stinchcomb et al., *Nature*, 282: 39 (1979)). O gene *trp1* fornece um marcador de seleção para uma estirpe mutante de levedura desprovida da capacidade para crescer em triptofano, por exemplo, ATCC No. 44076 ou PEP4-1. Jones, *Genetics*, 85: 12 (1977). A presença da lesão *trp1* no genoma da célula hospedeira de levedura fornece então um ambiente eficaz para detetar a transformação por crescimento na ausência de triptofano. De uma forma similar, estirpes de levedura deficientes em *Leu2* (ATCC 20 622 ou 38 626) são complementadas por plasmídeos conhecidos que contêm o gene

Leu2. Estirpes de levedura deficientes em *Ura3* são complementadas por plasmídeos conhecidos que contêm o gene *ura3*.

Adicionalmente, vetores derivados do plasmídeo circular pKD1 1.6 mm podem ser usados para transformação de leveduras *Kluyveromyces*. Alternativamente, um sistema de expressão para produção em larga escala de quimosina de vitelo recombinante foi reportado para *K. lactis*. Van den Berg, *Bio/Technology*, 8: 135 (1990). Vetores de expressão multi-cópia estáveis para secreção de albumina do soro recombinante humana madura por estirpes industriais de *Kluyveromyces* foram também divulgados. Fleer et al, *Bio/Technology*, 9: 968-975 (1991).

(4) Componente de promotor

Vetores de expressão e de clonagem usualmente contêm um promotor que é reconhecido pelo organismo hospedeiro e está ligado operativamente ao ácido nucleico que codifica o anticorpo. Promotores adequados para uso com hospedeiros proocarióticos incluem o promotor arabinose (e.g., *araB*) promotor *phoA*, sistemas promotores β -lactamase e lactose, fosfatase alcalina, um sistema promotor triptofano (*trp*), e promotores híbridos tal como o promotor *tac*. No entanto, outros promotores bacterianos conhecidos são adequados. Promotores para uso em sistemas de bactérias irão também conter uma sequência Shine-Dalgarno (S.D.) ligada operativamente ao DNA que codifica o anticorpo da divulgação.

São conhecidas sequências de promotor para eucariotas. Virtualmente todos os genes eucarióticos contêm uma região enriquecida em AT localizada aproximadamente 25 a 30 bases

a montante do local onde a transcrição é iniciada. Outra sequência encontrada 70 a 80 bases a montante do início da transcrição de muitos genes é uma região CNCAAT e em que N pode ser qualquer nucleótido. Na extremidade 3' da maioria dos genes eucarióticos está uma sequência AATAAA que pode ser o sinal para adição de uma cauda de poli A à extremidade 3' da sequência codificante. Todas estas sequências são adequadamente inseridas em vetores de expressão eucarióticos.

Exemplos de sequências promotoras para uso com hospedeiros de levedura incluem os promotores para 3-fosfoglicerato cinase ou outras enzimas glicolíticas, tais como enolase, gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase, hexocinase, piruvato descarboxilase, fosfofrutocinase, glucose-6-fosfato isomerase, 3-fosfoglicerato mutase, piruvato cinase, triosefosfato isomerase, fosfoglucose isomerase, e glucocinase.

Outros promotores de levedura, que são promotores induzíveis, tendo a vantagem adicional da transcrição controlada por condições de crescimento, são as regiões promotoras para a álcool desidrogenase 2, isocitocromo C, fosfatase ácida, enzimas degradativas associadas ao metabolismo do azoto, metalotioneína, gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase, e enzimas responsáveis pela utilização de maltose e galactose. Vetores e promotores adequados para uso na expressão em leveduras são adicionalmente descritos em EP 73 657. Acentuadores de leveduras são também usados de forma vantajosa com promotores de levedura.

A transcrição de anticorpos a partir de vetores em células hospedeiras de mamíferos é controlada, por exemplo, por promotores obtidos a partir dos genomas de vírus tal como

vírus da leucemia de Abelson, vírus polioma, vírus da varíola, adenovírus (tal como Adenovírus 2), vírus do papiloma bovino, vírus do sarcoma aviário, mais preferencialmente citomegalovírus, um retrovírus, vírus da hepatite B, Vírus Símio 40 (SV40), por promotores heterólogos de mamíferos, e.g., o promotor actina ou um promotor imunoglobulina, por promotores de choque térmico, desde que tais promotores sejam compatíveis com os sistemas das células hospedeiras.

Os promotores precoce e tardio do vírus SV40 são obtidos de forma conveniente como um fragmento de restrição SV40 que também contém a origem de replicação viral SV40. O promotor precoce imediato do citomegalovírus humano é obtido de forma conveniente como um fragmento de restrição HindIII E. Um sistema para expressar DNA em hospedeiros mamíferos usando o vírus do papiloma bovino como vetor é divulgado na Patente U.S. No. 4 419 446. Uma modificação deste Sistema é descrita na Patente U.S. No. 4 601 978. *Ver também* Reyes et al., Nature 297: 598-601 (1982) sobre a expressão do cDNA de β -interferão em células de ratinho sob o controlo de um promotor timidina cinase do herpes simplex vírus. Alternativamente, a repetição longa terminal do vírus do sarcoma de rous pode ser usada como promotor.

(5) Componente de elemento acentuador

A transcrição de um DNA que codifica o anticorpo por eucariotas superiores é muitas vezes aumentada através da inserção de uma sequência acentuadora no vetor. Muitas sequências acentuadores são agora conhecidas de genes mamíferos (globina, elastase, albumina, alfa-fetoproteína, e insulina). Tipicamente, no entanto, usar-se-á um acentuador de um vírus de células eucarióticas. Exemplos

incluem o acentuador SV40 no lado tardio da origem de replicação (pb 100-270), o acentuador do promotor precoce do citomegalovírus, o acentuador polioma no lado tardio da origem de replicação, e acentuadores adenovírus. Ver também Yaniv, Nature 297: 17-18 (1982) sobre os elementos acentuadores para a ativação de promotores eucarióticos. O acentuador pode ser *spliced* para o vetor numa posição 5' ou 3' para a sequência que codifica o anticorpo, mas está preferencialmente localizado num local 5' do promotor.

(6) Componente de terminação da transcrição

Os vetores de expressão usados em células hospedeiras eucarióticas (levedura, fungo, inseto, planta, animal, humano, ou célula nucleada de outros organismos multicelulares) irão também conter sequências necessárias para a terminação da transcrição e para estabilizar o mRNA. Tais sequências estão comumente disponíveis a partir das regiões não traduzidas 5' e, ocasionalmente 3', de DNAs ou cDNAs eucarióticos ou virais. Estas regiões contêm segmentos de nucleótidos transcritos como fragmentos poliadenilados na porção não traduzida do mRNA que codifica o anticorpo. Um componente de terminação da transcrição útil é a região de poliadenilação da hormona bovina do crescimento. Ver W094/11026 e o vetor de expressão aí divulgado. Outro é o terminador da transcrição da cadeia leve de imunoglobulina de ratinho.

(7) Seleção e transformação das células hospedeiras

Células hospedeiras adequadas para clonar ou expressar o DNA nos vetores aqui descritos são células de procariota, levedura, ou eucariotas superiores descritas acima. Procariotas adequados para este objetivo incluem

eubactérias, tais como organismos Gram-negativos ou Gram-positivos, por exemplo, *Enterobacteriaceae* tal como *Escherichia*, e.g., *E. coli*, *Enterobacter*, *Erwinia*, *Klebsiella*, *Proteus*, *Salmonella*, e.g., *Salmonella typhimurium*, *Serratia*, e.g., *Serratia marcescans*, e *Shigella*, bem como *Bacilli* tal como *B. subtilis* e *B. licheniformis* (e.g., *B. licheniformis* 41 P divulgado em DD 266 710, publicado em 12 de Abril de 1989), *Pseudomonas* tal como *P. aeruginosa*, e *Streptomyces*. Uma *E. coli* hospedeira de clonagem é *E. coli* 294 (ATCC 31 446), embora outras estirpes tais como *E. coli* B, *E. coli* X1776 (ATCC 31 537), e *E. coli* W3110 (ATCC 27 325) sejam adequadas. Estes exemplos são ilustrativos e não limitantes.

Para além dos procariotas, os micróbios eucarióticos tais como como fungos filamentosos ou leveduras são hospedeiros de clonagem ou expressão adequados para vetores codificantes de anticorpo. *Saccharomyces cerevisiae*, ou levedura de padeiro, é a mais comumente utilizada entre os microorganismos hospedeiros eucariotas inferiores. No entanto, um número de outros géneros, espécies, e estirpes estão comumente disponíveis e são aqui úteis, tal como *Schizosaccharomyces pombe*; hospedeiros *Kluyveromyces* tais como, e.g., *K. lactis*, *K. fragilis* (ATCC 12 424), *K. bulgaricus* (ATCC 16 045), *K. wickerhamii* (ATCC 24 178), *K. waltii* (ATCC 56 500), *K. drosophilae* (ATCC 36 906), *K. thermotolerans*, e *K. marxianus*; *Yarrowia* (EP 402 226); *Pichia pastoris* (EP 183 070); *Candida*; *Trichoderma reesei* (EP 244,234); *Neurospora crassa*; *Schwanniomyces* tal como *Schwanniomyces occidentalis*; e fungos filamentosos tais como, e.g., hospedeiros *Neurospora*, *Penicillium*, *Tolyocladium*, e *Aspergillus* tais como *A. nidulans* e *A. niger*.

Células hospedeiras adequadas para a expressão de anticorpo glicosilados são derivadas de organismos multicelulares. Exemplos de células de invertebrados são células de plantas e insetos. Numerosas estirpes baculovirais e variantes e células hospedeiras de inseto permissivo correspondente de hospedeiros tais como *Spodoptera frugiperda* (lagarta), *Aedes aegypti* (mosquito), *Aedes albopictus* (mosquito), *Drosophila melanogaster* (mosca da fruta), e *Bombyx mori* foram identificadas. Uma variedade de estirpes virais para transfeção estão publicamente disponíveis, e.g., a variante L-1 de *Autographa californica* NPV e a estirpe Bm-5 de *Bombyx mori* NPV, e tais vírus podem ser usados como os vírus aqui de acordo com a presente divulgação, particularmente para transfeção de células de *Spodoptera frugiperda*.

Culturas de células de plantas de algodão, milho, batata, soja, petúnia, tomate, tabaco, lemnácea, e outras células de plantas podem também ser utilizadas como hospedeiras.

No entanto, o interesse tem sido maior em células de vertebrados, e propagação das células de vertebrados em cultura (cultura de tecido) tornou-se procedimento de rotina. Exemplos de linhas celulares de mamíferos úteis são células de ovário de hamster chinês, incluindo as células CHOK1 (ATCC CCL61), DXB-11, DG-44, e células de ovário de hamster chinês/-DHFR (CHO, Urlaub et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77: 4216 (1980)); linha celular de rim de macaco CV1 transformada por SV40 (COS-7, ATCC CRL 1651); linha celular embrionária de rim humano (células 293 ou 293 subclonadas para crescimento em cultura de suspensão, [Graham et al., J. Gen Virol. 36: 59 (1977)]); células de rim de hamster bebé (BHK, ATCC CCL 10); células sertoli de ratinho (TM4, Mather, Biol. Reprod. 23: 243-251 (1980)); células de rim de macaco (CV1 ATCC CCL 70); células de rim

de macaco verde africano (VERO-76, ATCC CRL-1587); células de carcinoma cervical humano (HELA, ATCC CCL 2); células de rim de cão (MDCK, ATCC CCL 34); células de fígado de ratazana *buffalo* (BRL 3A, ATCC CRL 1442); células de pulmão humano (W138, ATCC CCL 75); células de fígado humano (Hep G2, HB 8065); tumor mamário de ratinho (MMT 060562, ATCC CCL51); células TRI (Mather et al., *Annals N.Y Acad. Sci.* 383: 44-68 (1982)); células MRC 5; células FS4; e uma linha de hepatoma humano (Hep G2).

As células hospedeiras são transformadas ou transfetadas com os vetores de expressão ou de clonagem acima descritos para produção de anticorpo e cultivamos em meios de nutrientes convencionais modificados de forma a serem apropriados para induzir promotores, selecionar transformantes, ou amplificar os genes que codificam as sequências desejadas. Adicionalmente, novos vetores e linhas celulares transfetadas com múltiplas cópias de unidades de transcrição separadas por um marcador seletivo são particularmente úteis e preferidas para a expressão de anticorpos dirigidos contra M-CSF.

(8) Cultura das células hospedeiras

As células hospedeiras usadas para produzir o anticorpo podem ser cultivadas numa variedade de meios. Meios comercialmente disponíveis tais como *Ham's F10* (Sigma), *Minimal Essential Medium* ((MEM), (Sigma), RPMI-1640 (Sigma), e *Dulbecco's Modified Eagle's Medium* ((DMEM), Sigma) são adequados para cultivar as células hospedeiras. Adicionalmente, qualquer um dos meios descritos em Ham et al., *Meth. Enz.* 58: 44 (1979), Barnes et al., *Anal. Biochem.* 102: 255 (1980), Patentes U.S. Nos. 4.767.704; 4.657.866; 4.927.762; 4.560.655; ou 5.122.469; WO90103430; WO

87/00195; ou Patente U.S. Re. No. 30.985 pode ser usado como meio de cultura para as células hospedeiras. Qualquer um destes meios pode ser suplementado como necessário com hormonas e/ou outros fatores de crescimento (tal como insulina, transferrina, ou fator de crescimento epidermal), sais (tal como cloreto de sódio, cálcio, magnésio, e fosfato), tampões (tal como HEPES), nucleótidos (tal como adenosina e timidina), antibióticos (tal como o fármaco Gentamicina™), elementos vestigiais (definidos como compostos inorgânicos usualmente presentes em concentrações finais no intervalo micromolar), e glucose ou uma fonte de energia equivalente. Quaisquer outros suplementos necessários podem ser também incluídos em concentrações apropriadas que serão conhecidas para um perito na especialidade. As condições de cultura, tais como temperatura, pH, e as restantes, são aquelas previamente usadas com a célula hospedeira selecionada para expressão, e será evidente para um perito na especialidade.

(9) Purificação do anticorpo

Quando se usam técnicas recombinantes, o anticorpo pode ser produzido intracelularmente, no espaço periplasmático, ou diretamente secretado para o meio, incluindo a partir de culturas microbianas. Se o anticorpo for produzido intracelularmente, como primeiro passo, os detritos particulados, ou células hospedeiras ou fragmentos lisados, é removido, por exemplo, por centrifugação ou ultrafiltração. Better et al. Science 240: 1041-1043 (1988); ICSU Short Reports 10: 105 (1990); e Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 457-461 (1993) descrevem um procedimento para isolar anticorpos que são secretados para o espaço periplasmático de *E. coli*. (ver também, [Carter et al., Bio/Technology 10: 163-167 (1992)]).

A composição de anticorpo preparada a partir de células microbianas ou de mamíferos podem ser purificadas usando, por exemplo, cromatografia catiónica de hidroxilapatite ou cromatografia de permuta aniônica, e cromatografia de afinidade, sendo a cromatografia de afinidade a técnica preferida. A adequabilidade da proteína A como um ligando de afinidade depende da espécie e isotipo de qualquer domínio de imunoglobulina Fc que está presente no anticorpo. A proteína A pode ser usada para purificar anticorpos que são baseados em cadeia pesadas humanas $\gamma 1$, $\gamma 2$, ou $\gamma 4$ (Lindmark et al., J. Immunol. Meth. 62: 1-13 (1983)). A proteína G é recomendada para todos os isotipos de ratinho para $\gamma 3$ humano (Guss et al., EMBO J. 5: 1567-1575 (1986)). A matriz à qual o ligando de afinidade está ligado é mais frequentemente a agarose, mas outras matrizes estão disponíveis. Matrizes mecanicamente estáveis tais como vidro de poro controlado ou poli(estireno-divinil)benzeno permitem fluxos mais rápidos e tempos de processamento mais curtos que podem ser conseguidos com a agarose. Onde o anticorpo compreende um domínio $C_H 3$, a resina *Bakerbond ABX*TM (J. T. Baker, Phillipsburg, N.J.) é útil para purificação. Outras técnicas para purificação de proteínas tais como fracionamento numa coluna de permuta iônica, precipitação de etanol, HPLC de fase reversa, cromatografia em sílica, cromatografia em heparina *SEPHAROSE*TM, cromatografia numa resina de permuta aniônica ou catiónica (tal como uma coluna de ácido poliaspártico), cromatofocagem, SDS-PAGE, e precipitação de sulfato de amônio estão também disponíveis, dependendo do anticorpo a ser recuperado.

Anticorpos quiméricos e humanizados

Uma vez que os anticorpos quiméricos ou humanizados são menos imunogênicos em humanos que os anticorpos monoclonais parentais de ratinho, podem ser usados para o tratamento de humanos com muito menor risco de anafilase. Assim, estes anticorpos podem ser preferidos em aplicações terapêuticas que envolvam a administração *in vivo* a um humano.

Anticorpos monoclonais quiméricos, em que os domínios variáveis Ig de um anticorpo monoclonal de ratinho são fundidos com os domínios constantes Ig humanos, podem ser gerados usando procedimentos padrão no estado da técnica (ver Morrison, S. L., et al. (1984) Quimeric Human Antibody Molecules; Mouse Antigen Binding Domains with Human Constant Region Domains, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81, 6841-6855; e, Boulianne, G. L., et al, Nature 312, 643-646. (1984)). Embora alguns anticorpos monoclonais quiméricos se tenham mostrado menos imunogênicos em humanos, os domínios variáveis Ig de ratinho podem ainda causar uma resposta humana anti-ratinho significativa.

Anticorpos humanizados podem ser obtidos a partir de uma variedade de métodos incluindo, por exemplo: (1) enxertar as regiões determinantes de complementaridade (CDRs) não humanas numa *framework* e região constante humanas (um processo referido no estado da técnica como humanizante através de "enxerto de CDR"), ou, alternativamente, (2) transplantar os domínios variáveis não humanos inteiros, mas "disfarçando-os" com um superfície semelhante à humana por substituição de resíduos da superfície (um processo referido no estado da técnica "veneering"). Na presente invenção, anticorpos humanizados irão incluir ambos os anticorpos "humanizado" e "veneered".

Estes métodos são divulgados em, e.g., Jones et al., *Nature* 321:522-525 (1986); Morrison et al., *Proc. Natl. Acad. Sci., U.S.A.*, 81:6851-6855 (1984); Morrison e Oi, *Adv. Immunol.*, 44:65-92 (1988); Verhoeyer et al., *Science* 239:1534-1536 (1988); Padlan, *Molec. Immun.* 28:489-498 (1991); Padlan, *Molec. Immunol.* 31(3):169-217 (1994); e Kettleborough, C.A. et al., *Protein Eng.* 4(7):773-83 (1991).

Em particular, um anticorpo de roedor na administração repetida *in vivo* no homem quer sozinho ou como um conjugado irão desencadear uma resposta imunitária no beneficiário contra o anticorpo de roedor; a chamada resposta HAMA (Anticorpo Humano Anti-Ratinho). A resposta HAMA pode limitar a eficácia do fármaco se forem necessárias doses repetidas. A imunogenicidade do anticorpo pode ser reduzida por modificação química do anticorpo com um polímero hidrofílico tal como polietileno glicol ou usando os métodos de engenharia genética para tornar a estrutura de ligação do anticorpo mais semelhante a humana. Por exemplo, as sequências de genes para os domínios variáveis do anticorpo de roedor que se liga a CEA podem ser substituídas para os domínios variáveis de uma proteína de mieloma humano, produzindo um anticorpo recombinante quimérico. Estes procedimentos são detalhados em EP 194276, EP 0120694, EP 0125023, EP 0171496, EP 0173494 e WO 86/01533. Alternativamente, as sequências genéticas das CDRs do anticorpo de roedor podem ser isoladas ou sintetizadas e substituídas para as regiões das sequências correspondentes de um gene humano homólogo de anticorpo, produzindo um anticorpo humano com a especificidade do anticorpo de roedor original. Estes procedimentos são descritos em EP 023940, WO 90/07861 e WO91/09967. Alternativamente, um elevado número de resíduos da superfície do domínio variável do anticorpo de roedor pode

ser modificado para aqueles resíduos normalmente encontrados num anticorpo humano homólogo, produzindo um anticorpo de roedor que tem uma superfície 'veneer' de resíduos e que irá assim ser conhecida como própria (*self*) pelo corpo humano. Esta abordagem foi demonstrada por Padlan et al. (1991) Mol. Immunol. 28, 489.

O enxerto de CDR envolve introduzir uma ou mais das seis CDRs dos domínios variáveis Ig da cadeia pesada e leve de ratinho nas quatro regiões *framework* apropriadas dos domínios variáveis Ig humanos é também designado enxerto de CDR. Esta técnica (Riechmann, L., et al., Nature 332, 323 (1988)), utiliza as regiões *framework* conservadas (FR1-FR4) como uma matriz para suportar os *loops* de CDR que são os contactos primários com o antigénio. Uma desvantagem do enxerto de CDR, no entanto, é que pode resultar num humanizado anticorpo que tem uma afinidade de ligação substancialmente mais baixa do que o anticorpo de ratinho original, porque os aminoácidos das regiões *framework* podem contribuir para a ligação ao antigénio, e porque os aminoácidos dos *loops* de CDR podem influenciar a associação dos dois domínios variáveis Ig. Para manter a afinidade do anticorpo monoclonal humanizado, a técnica de enxerto de CDR pode ser melhorada, escolhendo regiões *framework* humanas que se assemelham mais proximamente às regiões *framework* do anticorpo de ratinho original, e por mutagénesis dirigida (ao local) de aminoácidos únicos dentro das *framework* ou CDRs com auxílio de modelação computadorizada do local de ligação ao antigénio (e.g., Co, M. S., et al. (1994), J. Immunol. 152, 2968-2976).

Um método de imunizar anticorpos compreende alinhar as sequências não humanas de cadeia pesada e leve com as sequências humanas de cadeia pesada e leve, seleccionando e

substituído a *framework* não humana com uma *framework* humana com base em tal alinhamento, fazendo o modelo molecular para prever a conformação da sequência humanizada e comparando-a com a conformação do anticorpo parental. Este processo é seguido de mutação reversa de resíduos na região CDR que perturba a estrutura das CDRs até a conformação prevista do modelo de sequência humanizada se aproxime da conformação das CDRs não humanas do anticorpo não humano parental. Tais anticorpos humanizados podem ser adicionalmente derivatizados para facilitar a captação e eliminação, e.g., via recetores Ashwell (ver, e.g., Patentes U.S. Nos. 5.530.101 e 5.585.089).

Um número de humanizações de anticorpos monoclonais de ratinho por desenho racional foi reportado (ver, por exemplo, 20020091240 publicado a 11 de Julho de 2002, WO 92/11018 e Patente U.S. No., 5.693.762, Patente U.S. No. 5.766.866).

Variantes das sequências de aminoácidos

Um método útil para a identificação de certos resíduos ou regiões do anticorpo que são localizações preferidas para mutagénese é chamada "mutagénese de rastreio de alanina," tal como descrita por Cunningham e Wells Science, 244:1081-1085 (1989). Aqui, um resíduo ou grupo de resíduos alvo identificados (e.g., resíduos com carga tais como arg, asp, his, lys, e glu) e substituídos por um aminoácido neutro ou com carga negativa (mais preferencialmente alanina ou polialanina) para afetar a interação dos aminoácidos com o antigénio. Essas localizações de aminoácidos que demonstram sensibilidade funcional às substituições são então refinadas pela introdução de mais ou outras variantes em, ou para, os locais de substituição. Assim, enquanto o local

para introduzir uma variação de sequência de aminoácidos é predeterminado, a natureza da mutação per se não necessita de ser predeterminada. Por exemplo, para analisar o desempenho de uma mutação num dado local, rastreio de ala ou mutagénese aleatória é conduzido no codão ou região alvo e as variantes anticorpo expressas são rastreadas quanto à atividade desejada.

Inserções de sequência de aminoácidos incluem fusões amino- e/ou carboxi-terminais variando em comprimento de um resíduo a polipéptidos contendo cem ou mais resíduos, bem como inserções intra-sequência de um resíduo de aminoácido único ou múltiplos. Exemplos de inserções terminais incluem um anticorpo com um resíduo metionilo no terminal N ou o anticorpo (incluindo anticorpo fragmento) fundido a um epítopo marcador ou um epítopo de recetor de salvamento. Outras variantes de inserção da molécula de anticorpo incluem a fusão a um polipéptido que aumenta o tempo de meia vida do anticorpo no soro, e.g. no terminal N ou terminal C.

O termo "epítopo marcado" refere-se ao anticorpo fundido com um epítopo marcador. O polipéptido do epítopo marcador tem resíduos suficientes para fornecer um epítopo contra o qual possa ser feito um anticorpo, mas é curto o suficiente de modo a não interferir com a atividade do anticorpo. O epítopo marcador preferencialmente é suficientemente único para que o anticorpo dirigido contra o mesmo não reaja substancialmente de forma cruzada com outros epítopos. Polipéptidos marcadores adequados geralmente têm pelo menos 6 resíduos de aminoácidos e usualmente entre cerca de 8-50 resíduos de aminoácidos (preferencialmente entre cerca de 9-30 resíduos). Exemplos incluem o polipéptido marcador flu HA e o seu anticorpo 12CA5 [Field et al., Mol. Cell. Biol. 8: 2159-2165 (1988)]; o marcador c-myc e os anticorpos 8F9,

3C7, 6E10, G4, B7 e 9E10 para o mesmo [Evan et al., Mol. Cell. Biol. 5(12): 3610-3616 (1985)]; e o marcador glicoproteína D (gD) de vírus Herpes Simplex e o seu anticorpo [Paborsky et al., Protein Engineering 3(6): 547-553 (1990)]. Outros marcadores exemplificativos são uma sequência de poli-histidina, geralmente à volta de seis resíduos histidina, que permite o isolamento de um composto marcado usando quelação de níquel. Outras marcações e marcadores, tal como o marcador FLAG® (Eastman Kodak, Rochester, NY), bem conhecido e usado de forma rotineira no estado da técnica, são aqui divulgadas.

Tal como usado aqui, o termo "de ligação a recetor de salvamento" refere-se a um epítipo da região Fc de uma molécula IgG (e.g., IgG1, IgG2, IgG3, ou IgG4) que é responsável por aumentar o tempo de meia vida *in vivo* no soro da molécula IgG.

Outro tipo de variante é uma variante de substituição de aminoácidos. Estas variantes têm pelo menos um resíduo de aminoácido na molécula de anticorpo removido e um resíduo diferente inserido no seu lugar. A mutagénesis de substituição dentro de qualquer uma das regiões hipervariáveis ou CDR ou regiões *framework* é contemplada. Substituições conservativas são mostradas na Tabela 1. A substituição mais conservativa é encontrada sob o cabeçalho "substituições preferidas". Se tais substituições não resultarem em qualquer alteração na atividade biológica, então modificações mais substanciais, denominadas "substituições exemplificativas" na Tabela 1, ou como descrito adicionalmente abaixo com referência às classes de aminoácidos, podem ser introduzidas e os procedimentos rastreados.

Tabela 1.

Original	Exemplificativo	Substituições de Resíduos Preferidas
Ala (A)	val; leu; ile	val
Arg (R)	lys; gln; asn	lys
Asn (N)	gln; his; asp, lys; gln	Arg
Asp (D)	glu; asn	Glu
Cys (C)	ser; ala	Ser
Gln (Q)	asn; gln	asn
Glu (E)	asp; gln	Asp
Gly (G)	ala	
His (H)	asn; gln; lys; arg	
Ile (I)	leu; val; met; ala; phe;	leu norleucina
Leu (L)	norleucina; ile; val; met; ala; phe	Ile
Lys (K)	arg; gln; asn	Arg
Met (M)	leu; phe; ile	leu
Phe (F)	leu; val; ile; ala; tyr	
Pro (P)	Ala	
Ser (S)	thr	
Thr (T)	ser	Ser
Trp (W)	tyr; phe	tyr
Tyr (Y)	trp; phe; thr; ser	phe
Val (V)	ile; leu; met; phe; ala; norleucina	leu

Modificações substanciais nas propriedades biológicas do anticorpo são conseguidas selecionando substituições que diferem significativamente no seu efeito on mantendo (a) a estrutura da cadeia polipeptídica principal na área da substituição, por exemplo, como uma conformação em folha ou helicoidal, (b) a carga ou hidrofobicidade da molécula no sítio alvo, ou (c) o volume da cadeia lateral. Resíduos que ocorrem naturalmente são divididos em grupos com base nas propriedades comuns da cadeia lateral:

- (1) hidrofóbico: norleucina, met, ala, val, leu, ile;
- (2) neutro hidrofílico: cys, ser, thr;
- (3) ácido: asp, glu;
- (4) básico: asn, gln, his, lys, arg;
- (5) resíduos que influenciam a orientação da cadeia: gly, pro; e
- (6) aromático: trp, tyr, phe.

Substituições conservativas envolvem substituir um aminoácido com outro membro da sua classe. Substituições não conservativas envolvem substituir um membro de uma destas classes por um membro de outra classe.

Qualquer resíduo cisteína não envolvido na manutenção da conformação adequada do anticorpo monoclonal, humano, humanizado, Human Engineered™ ou variante pode também ser substituído, geralmente com serina, para melhorar a estabilidade conservativa da molécula e prevenir *crosslinking* aberrante. De uma forma recíproca, a(s) ligação(ões) cisteína podem ser adicionadas ao anticorpo para melhorar a sua estabilidade (particularmente onde o anticorpo é um fragmento de anticorpo tal como um fragmento Fv).

A maturação da afinidade envolve preparar e rastrear variantes de anticorpo que tenham substituições dentro das

CDRs de um anticorpo parental e selecionar variantes que tenham propriedades biológicas melhoradas tais como a afinidade de ligação relativamente ao anticorpo parental. Uma forma conveniente para gerar tais variantes de substituição é a maturação da afinidade usando exibição de fagos. Resumidamente, vários locais da região hipervariável (e.g. locais 6-7) são mutados para gerar todas as possíveis substituições amino em cada local. As variantes de anticorpo assim gerado são exibidas numa forma monovalente a partir de partículas filamentosas de fagos como fusões com o produto do gene III de M13 contido dentro de cada partícula. As variantes exibidas de fagos são então rastreadas quanto à sua atividade biológica (e.g. afinidade de ligação).

A mutagénese de rastreio de alanina pode ser realizada para identificar resíduos da região hipervariável que contribuem significativamente para a ligação ao antigénio. Alternativamente, ou adicionalmente, pode ser benéfico analisar a estrutura cristalina do complexo antigénio anticorpo para identificar pontos de contacto entre o anticorpo e o antigénio. Tais resíduos de contacto e resíduos próximos são candidatos a substituição de acordo com as técnicas aqui elaboradas. Uma vez que tais variantes sejam geradas, o painel de variantes é submetido a rastreio tal como aqui descrito e os anticorpos com propriedades superiores em um ou mais ensaios relevantes pode ser selecionado para desenvolvimento adicional.

As variantes de anticorpo podem também ser produzidas de tal modo que tenham um padrão de glicosilação modificado relativamente ao anticorpo parental, por exemplo, eliminando um ou mais grupos carboidrato encontrados no anticorpo, e/ou adicionando um ou mais locais de glicosilação que não estejam presentes nesse anticorpo.

A glicosilação de anticorpos é tipicamente ligada a N ou ligada a O. Ligada a N refere-se ao acoplamento do grupo carboidrato à cadeia lateral de um resíduo asparagina. As sequências tripeptídicas asparagina-X-serina e asparagina-X-treonina, em que X é qualquer aminoácido exceto prolina, são as sequências de reconhecimento para o acoplamento enzimático do grupo carboidrato à cadeia lateral de asparagina. A presença de qualquer uma das sequências tripeptídicas num polipéptido cria um local de glicosilação potencial. Assim, locais de glicosilação ligada a N podem ser adicionados a um anticorpo alterando a sequência de aminoácidos de tal modo que contenha uma ou mais destas sequências tripeptídicas. A glicosilação ligada a O refere-se ao acoplamento de um dos açúcares N-aceilgalactosamina, galactose, ou xilose a um hidroxiaminoácido, mais comumente serina ou treonina, embora 5-hidroxiprolina ou 5-hidroxilisina possam também ser usadas. Os locais de glicosilação ligada a O podem ser adicionados a um anticorpo, inserindo ou substituindo um ou mais resíduos serina ou treonina para a sequência do anticorpo original. A título de exemplo, os aminoácidos de RX1 nas posições 41-43 da Figura 4A (NGS) podem ser retidos. Alternativamente, apenas os aminoácidos 41 e 42 (NG) podem ser retidos.

De forma comum, variantes de sequências de aminoácidos do anticorpo Human Engineered™ terão uma sequência de aminoácidos tendo pelo menos 60% de identidade de sequência de aminoácidos com as sequências de aminoácidos do anticorpo Human Engineered™ original de ou a cadeia pesada ou a leve (e.g., tal como em qualquer uma das Figuras 19B a 22B) mais preferencialmente pelo menos 80%, mais preferencialmente pelo menos 85%, mais preferencialmente pelo menos 90%, e ainda mais preferencialmente pelo menos 95%, incluindo por exemplo, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%,

98%, 99%, e 100%. Identidade ou homologia com respeito a esta sequência é aqui definida como a percentagem de resíduos de aminoácidos na sequência candidata que são idênticos aos dos resíduos Human Engineered™, após alinhar as sequências e introduzir espaçamentos (*gaps*), se necessário. Para atingir a máxima percentagem de identidade de sequência, e não considerando quaisquer substituições conservativas (tal como definido na Tabela 1 acima) como parte da identidade de sequência. Nenhuma das extensões, eliminações, ou inserções N-terminais, C-terminais, ou internas na sequência do anticorpo deverá ser interpretada como afetando a identidade de sequência ou homologia. Assim, a identidade de sequência pode ser determinada através de métodos padrão que são comumente usadas para comparar a similaridade na posição dos aminoácidos de dois polipéptidos. Usando um programa de computador tal como BLAST ou FASTA, dois polipéptidos são alinhados para uma ótima correspondência dos seus aminoácidos respectivos (tanto ao longo da sequência completa de uma ou ambas as sequências, como ao longo de uma porção pré-determinada de uma ou ambas as sequências). Os programas fornecem uma *default opening penalty* e uma *default gap penalty*, e uma matriz de pontuação tal como PAM 250 [uma matriz de pontuação padrão; ver Dayhoff et al., em Atlas of Protein Sequence and Structure, vol. 5, supp. 3 (1978)] pode ser usada em conjunto com o programa de computador. Por exemplo, a percentagem de identidade pode ser calculada como: o número total de correspondências idênticas multiplicado por 100 e em seguida dividido pelo somatório do comprimento da sequência mais longa dentro do alcance de correspondência e o número de *gaps* introduzidos nas sequências mais longas de forma a alinhar as duas sequências.

Outras modificações do anticorpo são contempladas. Por exemplo, pode ser desejável modificar o anticorpo a respeito da sua função efetora, de tal modo a acentuar a eficácia do anticorpo no tratamento do cancro, por exemplo. Por exemplo resíduo(s) cisteína podem ser introduzidos na região Fc, permitindo assim a formação de ligações dissulfeto intercadeia nesta região. O anticorpo homodimérico assim gerado pode ter uma capacidade de internalização melhorada e/ou uma destruição celular mediada pelo complemento e citotoxicidade celular dependente do anticorpo (ADCC) aumentada. Ver Caron et al., J. Exp Med. 176: 1191-1195 (1992) e Shopes, B. J. Immunol. 148: 2918-2922 (1992). Anticorpos homodiméricos com atividade anti-tumoral melhorada podem também ser preparados usando *cross-linkers* heterobifuncionais tal como descrito em Wolff et al., Cancer Research 53: 2560-2565 (1993). Alternativamente, um anticorpo pode ser modificado tendo capacidades de lise complemento e ADCC melhoradas. Ver Stevenson et al., Anti-Cancer Drug Design 3: 219-230 (1989). Adicionalmente, foi mostrado que sequências dentro da CDR podem fazer com que um anticorpo se ligue a MHC Classe II e ative uma resposta indesejada das células T auxiliares. Uma substituição conservativa pode permitir que o anticorpo retenha a atividade de ligação e perca a sua capacidade de ativar uma resposta indesejada das células T. Ver também Steplewski et al., Proc Natl Acad Sci USA. 1988;85(13):4852-6, que descreveram anticorpos quiméricos em que uma região variável murina se juntou com regiões contantes humanas gamma 1, gamma 2, gamma 3, e gamma 4.

Pode ser desejável usar um fragmento de anticorpo, em vez de um anticorpo intacto, para aumentar a penetração do tumor, por exemplo. Neste caso, pode ser desejável modificar o fragmento de anticorpo de modo a aumentar o seu

tempo de meia vida no soro, por exemplo, adicionando moléculas tais como PEG ou outros polímeros solúveis em água, incluindo polímeros polissacáridos, a fragmentos de anticorpo para aumentar a meia vida. Isto pode também ser conseguido, por exemplo, pela incorporação de um epítopo de ligação a recetor de salvamento no fragmento de anticorpo (e.g., por mutação da região apropriada no fragmento de anticorpo ou por incorporação do epítopo num péptido marcador que é então fundido ao fragmento de anticorpo tanto na extremidade como no meio, e.g., por síntese de DNA ou péptidos) (ver e.g., WO96/32478).

O epítopo de ligação ao recetor de salvamento preferencialmente constitui uma região em que qualquer um ou mais resíduos de aminoácidos de um ou dois loops de um domínio Fc são transferidos para uma posição análoga do fragmento de anticorpo. Ainda mais preferencialmente, três ou mais resíduos de um ou dois loops do domínio Fc são transferidos. Ainda mais preferencialmente, o epítopo é retirado do domínio CH2 da região Fc (e.g., de um IgG) e transferido para a região CH1, CH3, ou VH, ou mais de uma tal região, do anticorpo. Alternativamente, o epítopo é retirado do domínio CH2 da região Fc e transferido para a região C.sub.L ou V.sub.L, ou ambas, do fragmento de. Ver também International applications WO 97/34631 e WO 96/32478 que descrevem variants de Fc a sua interação com o recetor de salvamento.

Assim, os anticorpos podem compreender uma porção Fc humana, uma porção Fc humana consendo, ou uma variante da mesma que retém a capacidade de interagir com o recetor de salvamento de Fc, incluindo variantes em que cisteínas envolvidas em ligações dissulfeto são modificadas ou removidas, e/ou em que um met é adicionado no terminal N

e/ou um ou mais dos 20 aminoácidos N-terminais são removidos, e/ou regiões que interagem com o complemento, tal como o local de ligação de Clq, são removidas, e/ou o local ADCC é removido [ver, e.g., Molec. Immunol. 29 (5): 633-9 (1992)].

Estudos prévios mapearam o local de ligação em IgG humano e murino para FcR primariamente para a região dobradiça inferior composta por resíduos IgG 233-239. Outros estudos propuseram segmentos alargados adicionais, e.g. Gly316-Lys338 para o recetor Fc I humano, Lys274-Arg301 e Tyr407-Arg416 para o recetor Fc rIII humano, ou descobriram alguns resíduos específicos fora da dobradiça inferior, e.g. Asn297 e Glu318 para IgG2b murino que interage com o recetor Fc II murino. O relato da estrutura cristalina 3.2-Å do fragmento Fc de IgG1 humano com o recetor Fc IIIA humano delineou resíduos IgG1 Leu234-Ser239, Asp265-Glu269, Asn297-Thr299, e Ala327-Ile332 como envolvidos na ligação ao recetor Fc IIIA. Foi sugerido com base na estrutura cristalina que, para além da dobradiça inferior (Leu234-Gly237), os resíduos nos *loops* FG do domínio IgG CH2 (resíduos 326-330) e BC (resíduos 265-271) podem ter um papel na ligação ao recetor Fc IIA. Ver Shields et al., J. Biol. Chem., 276(9):6591-6604 (2001). A mutação de resíduos dentro dos locais de ligação do recetor Fc pode resultar numa função efetora alterada, tal como ADCC ou atividade CDC alterada, ou tempo de meia vida alterado. Tal como descrito acima, potenciais mutações incluem inserção, eliminação ou substituição de um ou mais resíduos, incluindo substituição com alanina, uma substituição conservativa, substituição não conservativa, ou substituição com um resíduo de aminoácido correspondente à mesma posição de uma subclasse diferente de IgG (e.g. substituir um resíduo IgG1 com um IgG2 resíduo correspondente nessa posição).

Shields et al. reportaram que resíduos IgG1 envolvidos na ligação a todos os recetores Fc estão localizados no domínio CH2 proximal à dobradiça e pertencem a duas categorias: 1) posições que podem interagir diretamente com todos os FcR que incluem Leu234-Pro238, Ala327, e Pro329 (e possivelmente Asp265); 2) posições que influenciam a natureza dos carboidratos ou posição que incluem Asp265 e Asn297. Resíduos IgG1 adicionais que afetaram a ligação ao recetor Fc II são os seguintes: (maior efeito) Arg255, Thr256, Glu258, Ser267, Asp270, Glu272, Asp280, Arg292, Ser298, e (menos efeito) His268, Asn276, His285, Asn286, Lys290, Gln295, Arg301, Thr307, Leu309, Asn315, Lys322, Lys326, Pro331, Ser337, Ala339, Ala378, e Lys414. A327Q, A327S, P329A, D265A e D270A ligação reduzida. Para além dos resíduos identificados acima para todas as FcR, resíduos IgG1 adicionais que reduziram a ligação ao recetor Fc IIIA em 40% ou mais são os seguintes: Ser239, Ser267 (apenas Gly), His268, Glu293, Gln295, Tyr296, Arg301, Val303, Lys338, e Asp376. Variantes que melhoraram a ligação a FcRIIIA incluem T256A, K290A, S298A, E333A, K334A, e A339T. Lys414 mostrou uma redução de 40% na ligação a FcRIIA e FcRIIB, Arg416 uma redução de 30% para FcRIIA e FcRIIIA, Gln419 uma redução de 30% para FcRIIA e uma redução 40% para FcRIIB, e Lys360 um melhoramento até 23% FcRIIIA. Ver também Presta et al., *Biochem. Soc. Trans.* (2001) 30, 487-490.

Por exemplo, a patente dos Estados Unidos No. 6.194.551 descreve variantes com função efetora alterada contendo mutações na região Fc de IgG humana, na posição de aminoácido 329, 331 ou 322 (usando a numeração de Kabat), algumas das quais exibindo uma ligação reduzida a C1q ou atividade CDC. Como outro exemplo, patente dos Estados Unidos No. 6.737.056 descreve variantes com função efetora

alterada ou ligação ao recetor de Fc-gamma contendo mutações na região Fc de IgG humana, nas posições de aminoácidos 238, 239, 248, 249, 252, 254, 255, 256, 258, 265, 267, 268, 269, 270, 272, 276, 278, 280, 283, 285, 286, 289, 290, 292, 294, 295, 296, 298, 301, 303, 305, 307, 309, 312, 315, 320, 322, 324, 326, 327, 329, 330, 331, 333, 334, 335, 337, 338, 340, 360, 373, 376, 378, 382, 388, 389, 398, 414, 416, 419, 430, 434, 435, 437, 438 ou 439 (usando a numeração de Kabat), algumas das quais exibindo perfis de ligação a recetor associados a uma atividade ADCC ou CDC reduzida. Destas, uma mutação nas posições de aminoácidos 238, 265, 269, 270, 327 ou 329 é mencionada como reduzindo a ligação a FcRI, uma mutação nas posições de aminoácidos 238, 265, 269, 270, 292, 294, 295, 298, 303, 324, 327, 329, 333, 335, 338, 373, 376, 414, 416, 419, 435, 438 ou 439 é mencionada como reduzindo a ligação a FcRII, e uma mutação nas posições de aminoácidos 238, 239, 248, 249, 252, 254, 265, 268, 269, 270, 272, 278, 289, 293, 294, 295, 296, 301, 303, 322, 327, 329, 338, 340, 373, 376, 382, 388, 389, 416, 434, 435 ou 437 é mencionada como reduzindo a ligação a FcRIII.

A patente dos Estados Unidos No. 5.624.821 relata que a atividade de ligação a Clq de um anticorpo murino pode ser alterada através da mutação do resíduo de aminoácido 318, 320 ou 322 da cadeia pesada e que a substituição do resíduo 297 (Asn) resulta na remoção da atividade lítica.

A publicação do Pedido de patente dos Estado Unidos No. 20040132101 descreve variantes com mutações nas posições de aminoácidos 240, 244, 245, 247, 262, 263, 266, 299, 313, 325, 328, ou 332 (usando a numeração de Kabat) ou posições 234, 235, 239, 240, 241, 243, 244, 245, 247, 262, 263, 264, 265, 266, 267, 269, 296, 297, 298, 299, 313, 325, 327, 328, 329, 330, ou 332 (usando a numeração de Kabat), das quais

as mutações nas posições 234, 235, 239, 240, 241, 243, 244, 245, 247, 262, 263, 264, 265, 266, 267, 269, 296, 297, 298, 299, 313, 325, 327, 328, 329, 330, ou 332 podem reduzir a atividade ADCC ou reduzir a ligação a um recetor Fc gamma.

Chappel et al., Proc Natl Acad Sci USA. 1991;88(20):9036-40 reportaram que a atividade citofílica de IgG1 é uma propriedade intrínseca do seu domínio CH2 da cadeia pesada. Mutações num ponto único em qualquer um dos resíduos de aminoácido 234-237 de IgG1 baixaram significativamente ou aboliram a sua atividade. A substituição de todos os resíduos 234-237 (LLGG) de IgG1 em IgG2 e IgG4 foram necessários para restaurar uma completa atividade de ligação. Um anticorpo IgG2 contendo a sequência ELLGGP completa (resíduos 233-238) foi observado como sendo mais ativo que IgG1 selvagem.

Isaacs et al., J Immunol. 1998;161(8):3862-9 relataram que mutações com um motivo crítico para a ligação de Fc gammaR binding (glutamato 233 para prolina, leucina/fenilalanina 234 para valina, e leucina 235 para alanina) preveniu completamente a eliminação de células alvo. A mutação glutamato 318 para alanina eliminou a função efetora de IgG2b de ratinho e reduziu também a potência de IgG4 humano.

Armour et al., Mol Immunol. 2003;40(9):585-93 identificaram variantes IgG1 que reagem com o recetor ativador, FcgammaRIIa, pelo menos 10-vezes menos eficientemente que IgG1 selvagem mas cuja ligação ao recetor inibidor, FcgammaRIIb, é apenas reduzida em quatro vezes. As mutações foram realizadas numa região de aminoácidos 233-236 e/ou nas posições de aminoácidos 327, 330 e 331. Ver também WO 99/58572.

Xu et al., J Biol Chem. 1994;269(5):3469-74 relatou que a mutação de IgG1 Pro331 para Ser diminuiu marcadamente a ligação de Clq e virtualmente eliminou a atividade lítica. Em contraste, a substituição de Pro para Ser331 em IgG4 outorgou a atividade lítica parcial (40%) para a variante IgG4 Pro331.

Schuurman et al., Mol Immunol. 2001;38(1):1-8 reportou que a mutação de uma das cisteínas dobradiça envolvidas na formação da ligação inter-cadeia pesada, Cys226, para serina resultou numa ligação inter-cadeia pesada mais estável. A mutação da sequência dobradiça de IgG4 Cys-Pro-Ser-Cys para a sequência dobradiça de IgG1 Cys-Pro-Pro-Cys também estabilizou marcadamente a interação covalente entre as cadeias pesadas.

Angal et al., Mol Immunol. 1993;30(1):105-8 reportou que mutar a serina na posição de aminoácido 241 em IgG4 para prolina (encontrada nessa posição em IgG1 e IgG2) levou à produção de um anticorpo homogêneo, bem como à extensão do tempo de meia vida do soro bem como o melhoramento da distribuição de tecido comparativamente ao IgG4 quimérico original.

Anticorpos Humanos e Human Engineered™

Human Engineering™

Têm sido descritos Human Engineering™ de domínios de anticorpo variáveis por Studnicka [ver, e.g., Studnicka et al. Patente U.S. No. 5 766 886; Studnicka et al. Protein Engineering 7: 805-814 (1994)] como um método para a redução da imunogenicidade ao mesmo tempo que mantém a atividade de ligação de moléculas de anticorpo. De acordo com o método, foi atribuído a cada região de aminoácidos

variável um risco de substituição. As substituições de aminoácidos são distinguidas por uma de três categorias: (1) alterações de baixo risco são aquelas que têm o maior potencial para reduzir a imunogenicidade com a menor probabilidade de causar a disrupção da ligação ao antigénio; (2) alterações de risco moderado são aquelas que iriam reduzir adicionalmente a imunogenicidade, mas com uma grande probabilidade de afetar a ligação ao antigénio ou o "enovelamento" da proteína; (3) resíduos de risco alto são aqueles que são importantes para a ligação ou para a manutenção da estrutura do anticorpo e carregam o mais alto risco de que a ligação ao anticorpo ou o enovelamento da proteína sejam afetados. Devido ao papel estrutural tri-dimensional das prolinas, as modificações em prolinas são, de um modo geral, consideradas como sendo pelo menos alterações de risco moderado, mesmo se a posição for de um modo típico uma posição de baixo risco.

As regiões variáveis das cadeias leve e pesada de um anticorpo de roedor são Human Engineered™ tal como se segue para substituir os aminoácidos humanos nas posições determinadas como sendo pouco prováveis de causar efeitos adversos tanto na ligação do antigénio como no enovelamento da proteína, mas sendo prováveis de reduzir a imunogenicidade num ambiente humano. Os resíduos de aminoácidos que se encontram em posições de "baixo risco" e que são candidatos para modificações de acordo com o método são identificados alinhando as sequências de aminoácidos das regiões variáveis de roedor com uma sequência da região variável humana. Qualquer região variável humana pode ser utilizada, incluindo uma sequência individual VH ou VL, uma sequência consenso humana VH ou VL ou uma sequência de linha germinal consenso ou individual humana. Os resíduos de aminoácido em qualquer número das posições de risco baixo, ou em todas as posições de risco baixo, podem ser

alterados. Por exemplo, em cada posição de risco baixo onde os resíduos de aminoácidos de murino e humano diferem, é introduzida uma modificação que substitui o resíduo de murino pelo resíduo humano. De um modo alternativo, os resíduos de aminoácido em todas as posições de risco baixo e em qualquer número das posições de risco moderado podem ser alteradas. De um modo ideal, para atingir a menor imunogenicidade todas as posições de risco baixo e moderado são alteradas de sequências de roedor para humanas.

Os genes sintéticos contendo regiões variáveis de cadeia pesada e/ou leve são construídos e ligados a regiões constantes de cadeia pesada e/ou leve *kappa* humanas. Quaisquer regiões constantes de cadeia leve e pesada pode ser utilizada em combinação com as regiões variáveis de anticorpo Human Engineered™, incluindo IgA (de qualquer subclasse, tal como IgA1 ou IgA2), IgD, IgE, IgG (de qualquer subclasse, tal como IgG1, IgG2, IgG3, ou IgG4), ou IgM. Os genes humanos de cadeia pesada e leve são introduzidos em células hospedeiras, tais como células de mamífero, e os produtos de imunoglobulina resultantes são obtidos e caracterizados.

Anticorpos humanos de animais transgênicos

Podem também ser produzidos anticorpos humanos contra M-CSF utilizando animais transgênicos sem produção de imunoglobulina endógena e que são sujeitos a engenharia genética para conter os *loci* de imunoglobulina humana. Por exemplo, a patente WO 98/24893 descreve animais transgênicos contendo um locus de Ig humana no qual os animais não produzem imunoglobulinas endógenas funcionais devido à inativação dos *loci* das cadeias pesada e leve endógenas. A patente WO 91/741 também descreve hospedeiros

mamíferos não-primatas transgênicos capazes de desencadear uma resposta imunitária a um imunogénio, na qual os anticorpos têm regiões constantes e/ou variáveis de primata, e na qual as imunoglobulinas endógenas que codificam para loci são substituídas ou inativadas. O WO 96/30498 descreve a utilização do sistema Cre/Lox para modificar o locus de imunoglobulina num mamífero, de forma a substituir todas ou uma porção das regiões constante ou variável para formar uma molécula de anticorpo modificada. O WO 94/02602 descreve hospedeiros mamíferos não humanos com loci Ig endógeno inativado e loci Ig humano funcional. A Patente U.S. No. 5 939 598 descreve métodos de produzir ratinhos transgênicos nos quais os ratinhos não têm as cadeias pesadas endógenas e expressam um locus de imunoglobulina exógeno compreendendo uma ou mais regiões constantes xenogénicas.

Utilizando um animal transgênico acima descrito, pode ser produzida uma resposta imunitária para uma molécula de antigénio selecionada, e podem ser removidas do animal células produtoras de anticorpo e utilizadas para produzir hibridomas que secretam anticorpos monoclonais humanos. Os protocolos de imunização, adjuvantes e semelhantes são conhecidos no estado da técnica e são utilizados na imunização de, por exemplo, um ratinho transgênico tal como descrito em WO 96/33735. Esta publicação descreve anticorpos monoclonais contra uma variedade de moléculas antigénicas incluindo IL 6, IL 8, TNFa, CD4 humana, selectina L, gp39, e toxina do tétano. Os anticorpos monoclonais podem ser testados quanto à sua capacidade de inibir ou neutralizar a atividade biológica ou efeito fisiológico da proteína correspondente. O WO 96/33735 descreve que os anticorpos monoclonais contra IL-8, derivados de células imunitárias de ratinhos transgênicos imunizados com IL-8, e IL-8 bloqueada induziam funções de

neutrofilos. Os anticorpos monoclonais humanos com especificidade para o antigénio utilizado para imunizar animais transgênicos são também descritos em WO 96/34096 e no pedido de patente U.S. No. 20030194404; e no pedido de patente U.S. No. 20030031667.

Ver também Jakobovits et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90:2551 (1993); Jakobovits et al., Nature, 362:255-258 (1993); Bruggermann et al., Year in Immuno., 7:33 (1993); e Pat. U.S. No. 5 591 669, Pat. U.S. No. 5 589 369, Pat. U.S. No. 5 545 807; e Pedido de Patente U.S. No. 20020199213. O Pedido de Patente U.S. No. 20030092125 descreve métodos para influenciar a resposta imunitária de um animal com o epítipo desejado. Os anticorpos humanos podem também ser gerados através de células B ativadas *in vitro* (ver patentes U.S, No.s 5 567 610 e 5 229 275).

Anticorpos humanos de tecnologia de exibição de fagos
(*phage display*)

O desenvolvimento de tecnologias para fazer reportórios de genes de anticorpo humanos recombinantes, e a disposição dos fragmentos de anticorpo codificados na superfície do bacteriófago filamentosos, têm fornecido um meio para fazer anticorpos humanos de forma direta. Os anticorpos produzidos através da tecnologia de *phage display* são produzidos como fragmentos de ligação ao antigénio, de um modo usual fragmentos Fv ou Fab - em bactérias e desse modo sem as funções efetoras. As funções efetoras podem ser introduzidas através de uma de duas estratégias: os fragmentos podem ser sujeitos a engenharia tanto em anticorpos completos para a expressão de células de mamífero, ou em fragmentos de anticorpo biespecíficas com um segundo local de ligação capaz de despoletar uma função efetora.

De um modo típico, o fragmento Fd (VH-CH1) e a cadeia leve (VL-CL) de anticorpos são clonados em separado através de PCR e recombinados ao acaso em bibliotecas combinatoriais de *phage display*, os quais podem depois ser selecionados para ligação a um antigénio particular. Os fragmentos Fab são expressados na superfície do fago, i.e., ligados fisicamente aos genes que os codificam. Assim, a seleção de Fab pelos co-seletores de ligação ao antigénio codificam para as sequências de Fab, as quais podem ser amplificadas de modo subsequente. Através de vários ciclos de ligação ao antigénio e re-amplificação, um procedimento de *termed panning*, são enriquecidos e finalmente isolados fragmentos Fab específicos para o antigénio.

Em 1994, uma aproximação à humanização de anticorpos, designada de "seleção guiada", foi descrita. A seleção guiada utiliza o poder da técnica de *phage display* para a humanização de anticorpo monoclonal de ratinho (Ver Jaspers, L. S., et al., *Bio/Technology* 12, 899-903 (1994)). Para isto, o fragmento Fd do anticorpo monoclonal de ratinho pode ser disposto em combinação com uma biblioteca de cadeia leve humana, e a biblioteca de híbrido Fab resultante pode então ser selecionada com antigénio. O fragmento Fd de ratinho fornece então um modelo para guiar a seleção. De um modo subsequente, as cadeias leves humanas selecionadas são combinadas com uma biblioteca de fragmentos Fd humanos. A seleção das bibliotecas resultantes resulta inteiramente em Fab humana.

Tem sido descrita uma variedade de procedimentos para a derivação de anticorpos humanos a partir de bibliotecas de *phage-display* (Ver, por exemplo, Hoogenboom et al., *J. Mol. Biol.*, 227:381 (1991); Marks et al., *J. Mol. Biol.*, 222:581-

597 (1991); Pat. U.S. No.s 5 565 332 e 5 573 905; Clackson, T., e Wells, J. A., TIBTECH 12, 173-184 (1994)). De um modo particular, a seleção *in vitro* e evolução de anticorpos derivados de bibliotecas de tecnologia de *phage display* tornou-se uma ferramenta muito poderosa (Ver Burton, D. R., e Barbas III, C. F., Adv. Immunol. 57, 191-280 (1994); e, Winter, G., et al., Annu. Rev. Immunol. 12, 433-455 (1994); Pedido de Patente U.S. No. 20020004215 e W092/01047; Pedido de Patente U.S. No. 20030190317 publicado a 9 de Outubro de 2003, e Patente U.S. No. 6 054 287; Patente U.S. No. 5 877 293.

Watkins, "Screening of Phage-Expressed Anticorpo Libraries by Capture Lift," Methods in Molecular Biology, Antibody Phage Display: Methods and Protocols 178: 187-193, e Pedido de Patente U.S. No. 200120030044772 publicado a 6 de Março de 2003 descrevem métodos para o rastreio de bibliotecas de fagos com expressão de anticorpos ou outras moléculas de ligação através de *capture lift*, um método que envolve a imobilização das moléculas de ligação candidatas num suporte sólido.

Os produtos do anticorpo podem ser rastreados quanto à atividade e adequabilidade em métodos de tratamento aqui descritos utilizando ensaios tal como descritos na secção intitulada "Métodos de Rastreio" ou utilizando quaisquer ensaios adequados conhecidos no estado da técnica.

Outras modificações covalentes

Estão também incluídas no âmbito desta descrição modificações covalentes do anticorpo. Estas podem ser efetuadas através de síntese química ou por clivagem enzimática ou química do anticorpo, se aplicável. Outros

tipos de modificações covalentes do anticorpo são introduzidas na molécula através da reação de resíduos alvo de aminoácidos do anticorpo com um agente orgânico derivado que seja capaz de reagir com cadeias laterais selecionadas ou com resíduos N- ou C-terminais.

De um modo mais comum são colocados resíduos cisteinilo em reação com α -haloacetatos (e aminas correspondentes), tais como ácido cloroacético ou cloroacetamida, para originar derivados carboximetilo ou carboxiamidometilo. Resíduos cisteinilo são também derivatizados por reação com bromotri-fluoroacetona, ácido alfa-bromo- β -(5-imidozoi)l)propiónico, fosfato de cloroacetilo, N-alquilmaleimidias, dissulfeto de 3-nitro-2-piridilo, dissulfeto de metil 2-piridilo, p-cloromercuribenzoato, 2-cloromercuri-4-nitrofenol, ou cloro-7-nitrobenzo-2-oxa-1,3-diazol.

São derivatizados resíduos histidilo por reação com dietilpirocarbonato a pH 5,5 - 7,0 uma vez que este agente é relativamente específico para a cadeia lateral histidilo. O brometo de para-bromofenacilo é também útil; a reação é realizada de um modo preferencial em cacodilato de sódio a 0,1 M a pH 6,0.

Resíduos lisinilo e amino-terminal são colocados em reação com anidridos de ácido succínico ou outro ácido carboxílico. A derivatização com estes agentes tem o efeito de reverter a carga dos resíduos lisinilo. Outros agentes apropriados para derivatizar resíduos contendo alfa-amino incluem imidoésteres tais como picolinimidato de metilo, fosfato de piridoxal, piridoxal, cloroborohidreto, ácido trinitrobenzenosulfónico, O-metilisourea, 2,4-

pentanodiona, e reação catalisada por transaminase com glioxilato.

Resíduos arginilo são modificados por reação com um ou vários reagentes convencionais, entre estes fenilgloxal, 2,3-butanodiona, 1,2-ciclohexanodiona, e ninidrina. A derivatização de resíduos de arginina requer que a reação seja realizada em condições alcalinas devido ao elevado pKa do grupo funcional guanidina. De um modo adicional, estes reagentes podem reagir com os grupos de lisina assim como com o grupo epsilon amino de arginina.

A modificação específica de resíduos tirosilo pode ser efetuada, com particular interesse em introduzir marcas espectrais em resíduos tirosilo através de reação com compostos aromáticos de diazônio ou tetranitrometano. De um modo mais comum, são utilizados N-acetilimidazol e tetranitrometano para originar espécies tirosil de O-acetilo e derivados 3-nitro, respetivamente. Os resíduos tirosilo são iodados utilizando ^{125}I ou ^{131}I para preparar proteínas marcadas para utilização em radioimunoensaio.

Os grupos laterais carboxilo (aspartilo ou glutamilo) são modificados de um modo seletivo por reação com carbodiimidias ($\text{R-N.dbd.C.dbd.N-R}'$), onde R e R' são diferentes grupos alquilo, tais como carbodiimida de 1-ciclohexil-3-(2-morfolinil-4-etilo) ou carbodiimida de 1-etil-3-(4-azonia-4,4-dimetilpentilo). Além disso, os resíduos aspartilo e glutamilo são convertidos em resíduos de asparaginilo e glutaminilo através de reação com iões amónio.

De um modo frequente, resíduos glutaminilo e asparaginilo são desamidados nos correspondentes resíduos glutamilo e

aspartilo, respetivamente. Estes resíduos são desamidados sob condições neutras ou alcalinas. A forma desamidada destes resíduos encontra-se no âmbito desta descrição.

Outras modificações incluem hidroxilação de prolina e lisina, fosforilação de grupos hidroxilo de resíduos serilo ou treonilo, metilação dos grupos .alpha.-amino de cadeias laterais de lisina, arginina e histidina (T. E. Creighton, *Proteins: Structure e Molecular Properties*, W.H. Freeman & Co., San Francisco, pág. 79-86 (1983)), acetilação da amina N-terminal, e amidação de qualquer grupo carboxilo C-terminal.

Outro grupo de modificações covalentes envolve acoplamento químico ou enzimático de glicósidos ao anticorpo. Estes procedimentos são vantajosos no sentido em que não requerem produção do anticorpo numa célula hospedeira que tenha capacidades de glicosilação para glicosilação associada a N ou O. Dependendo do modo de acoplamento utilizado, o açúcar(es) pode estar ligado a (a) arginina e histidina, (b) grupos carboxilo livres, (c) grupos sulfidriilo livres tais como os de cisteína, (d) grupos hidroxilo livres tais como os de serina, treonina, ou hidroxiprolina, (e) resíduos aromáticos tais como os de fenilalanina, tirosina, ou triptofano, ou (f) o grupo amida de glutamina. Estes métodos são descritos em W087/05330 publicado a 11 Setembro de 1987, e em Aplin & Wriston, *CRC Crit. Rev. Biochem.*, pág. 259-306 (1981).

A remoção de quaisquer porções carbohidrato presentes no anticorpo pode ser conseguida de forma química ou enzimática. A deglicosilação química requer exposição do anticorpo ao composto ácido trifluorometanosulfónico, ou um composto equivalente. Este tratamento resulta na clivagem da maioria ou da totalidade dos açúcares exceto o açúcar de

ligação (N-acetilglucosamina ou N-acetilgalactosamina), deixando o anticorpo intacto. A deglicosilação é descrita por Hakimuddin, *et al.* Arch. Biochem. Biophys. 259: 52 (1987) e por Edge *et al.* Anal. Biochem., 118: 131 (1981). A clivagem enzimática de porções carboidrato nos anticorpos pode ser conseguida pela utilização de uma variedade de endo- e exoglicosidases tal como descrito por Thotakura *et al.* Meth. Enzymol. 138: 350 (1987).

Outro tipo de modificação covalente do anticorpo compreende a ligação do anticorpo a um de uma variedade de polímeros não proteicos, *e.g.*, polietilenoglicol, polipropilenoglicol, polióis polioxietilados, sorbitol polioxietilado, glicose polioxetilada, glicerol polioxietilado, polioxialquilenos, ou polímeros de polissacáridos tais como dextrano. Tais métodos são conhecidos na técnica, ver, *e.g.* Patentes U.S No.s. 4 640 835; 4 496 689; 4 301 144; 4 670 417; 4 791 192, 4 179 337, 4 766 106, 4 179 337, 4 495 285, 4 609 546 ou EP 315 456.

Terapia genética

O transporte de um anticorpo terapêutico para as células apropriadas pode ser efetuado através de terapia genética *ex vivo*, *in situ*, ou *in vivo* através de utilização de qualquer abordagem apropriada conhecida na técnica, incluindo a utilização de métodos físicos de transferência de DNA (*e.g.*, lipossomas ou tratamentos químicos) ou através da utilização de vetores virais (*e.g.*, adenovírus, vírus adeno-associados, ou um retrovírus). Por exemplo, para terapia *in vivo*, um ácido nucleico codificando o anticorpo desejado, quer isolado quer em conjunção com um vetor, lipossoma, ou precipitado pode ser injetado diretamente no indivíduo, e pode ser injetado no local onde

a expressão do anticorpo é desejada. Para tratamento *ex vivo*, as células do indivíduo são removidas, o ácido nucleico é introduzido nestas células, e as células modificadas são devolvidas ao indivíduo quer diretamente ou, por exemplo, encapsuladas em membranas porosas as quais são implantadas no doente. Ver, e.g. Pat. U.S. No.s 4 892 538 e 5 283 187. Existe uma variedade de técnicas disponíveis para introduzir ácidos nucleicos em células viáveis. As técnicas variam dependendo se o ácido nucleico é transferido em células em cultura *in vitro*, ou *in vivo* nas células do hospedeiro pretendido. Técnicas apropriadas para a transferência de ácido nucleico em células de mamífero *in vitro* incluem a utilização de lipossomas, electroporação, microinjeção, fusão celular, DEAE-dextrano, e precipitação com fosfato de cálcio. Um vetor utilizado de um modo comum para transporte de ácido nucleico *ex vivo* é um retrovírus.

Outras técnicas de transferência de ácido nucleico *in vivo* incluem transfeção com vetores virais (tais como adenovírus, vírus Herpes simplex I, ou vírus adeno-associados) e sistemas baseados em lípidos. O ácido nucleico e agente de transfeção são associados de um modo opcional com uma micropartícula. Exemplos de agentes de transfeção incluem co-precipitação com fosfato de cálcio ou cloreto de cálcio, transfeção mediada por DEAE-dextrano, anfifílico de amónio quaternário DOTMA (brometo de (dioleoiloxipropilo) trimetilamonio, comercializado como Lipofectin pela GIBCO-BRL) (Felgner *et al.*, (1987) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84, 7413-7417; Malone *et al.* (1989) Proc. Natl Acad. Sci. USA 86 6077-6081); di-ésteres de glutamato lipofílicos com cabeças trimetilamónio pendentas (Ito *et al.* (1990) Biochem. Biophys. Acta 1023, 124-132); os lípidos parentais metabolizáveis tais como o

lípido catiónico glicilespermina de dioctadecilamido (DOGS, Transfectam, Promega) e etanolamilespermina de dipalmitoilfosfatidilo (DPPES) (J. P. Behr (1986) *Tetrahedron Lett.* 27, 5861-5864; J. P. Behr *et al.* (1989) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86, 6982-6986); sais de amónio quaternário metabolizáveis (DOTB, metilssulfato de N-(1-[2,3-dioleoiloxi]propil)-N,N,N-trimetilamónio (DOTAP) (Boehringer Mannheim), polietilenoimina (PEI), ésteres de dioleóilo, ChoTB, ChoSC, DOSC) (Leventis *et al.* (1990) *Biochim. Inter.* 22, 235-241); colesterol de 3beta[N-(N', N'-dimetilaminoetano)-carbamoil] (DC-Chol), etaloamina de dioleoilfosfatidilo (DOPE)/3beta[N-(N', N'-dimetilaminoetano)-carbamoil]colesterolDC-Chol em misturas um para um (Gao *et al.*, (1991) *Biochim. Biophys. Acta* 1065, 8-14), espermina, espermidina, lipopoliaminas (Behr *et al.*, *Bioconjugate Chem.* 1994, 5: 382-389), polilisinas lipofílicas (LPLL) (Zhou *et al.*, (1991) *Biochim. Biophys. Acta* 939, 8-18), hidróxido de [[(1,1,3,3-tetrametilbutil)cre-soxi]etoxi]etil]dimetilbenzilamónio (hidróxido DEBDA) com excesso de fosfatidilcolina/colesterol (Ballas *et al.*, (1988) *Biochim. Biophys. Acta* 939, 8-18), misturas brometo de cetiltrimetilamónio (CTAB)/DOPE (Pinnaduwage *et al.*, (1989) *Biochim. Biophys. Acta* 985, 33-37), di-éster lipofílico de ácido glutâmico (TMAG) com DOPE, CTAB, DEBDA, brometo de didodecilamónio (DDAB), e esterilamina em mistura com fosfatidiletanolamina (Rose *et al.*, (1991) *Biotechnique* 10, 520-525), DDAB/DOPE (TransfectACE, GIBCO BRL), e lípidos contendo oligogalactose. Exemplos de agentes potenciadores de transfeção que aumentam a eficácia da transferência incluem, por exemplo, DEAE-dextrano, polibreno, péptido disruptor de lisossomas (Ohmori N I *et al.*, *Biochem Biophys Res Commun Jun.* 27, 1997;235(3):726-9), proteoglicanos baseados em condroitano, proteoglicanos sulfatados,

polietilenoimina, polilisina (Pollard H *et al.* J Biol Chem, 1998 273 (13):7507-11), péptido de ligação a integrinas CYGGRGDTP, nonassacárido de dextrano linear, glicerol, grupos colesterilo unidos na ligação internucleósido 3-terminal de um oligonucleótido (Letsinger, R. L. 1989 Proc Natl Acad Sci USA 86: (17):6553-6), lisofosfatida, lisofosfatidilcolina, lisofosfatiletanolamina e lisofosfatidilcolina de 1-oleoilo.

Em algumas situações pode ser desejável transportar o ácido nucleico com um agente que direcione o vetor contendo o ácido nucleico para as células alvo. Tais moléculas de "direcionamento" incluem anticorpos específicos para uma proteína de membrana de superfície celular na célula alvo, ou um ligando para um recetor na célula alvo. Quando são utilizados lipossomas, podem ser utilizadas proteínas que se liguem a uma proteína de membrana de superfície celular associada a endocitose para direcionamento e/ou para facilitar a assimilação. Exemplos destas proteínas incluem proteínas da cápside e seus fragmentos trópicos para um tipo de célula particular, anticorpos para proteínas que sofrem internalização no ciclo celular, e proteínas que direcionem para uma localização intracelular e aumentam o tempo de semivida intracelular. De um modo alternativo, pode ser utilizada endocitose mediada por recetores. Tais métodos são descritos, por exemplo, em Wu *et al.*, 1987 ou Wagner *et al.*, 1990. Para revisão dos protocolos conhecidos atualmente de marcação de genes e terapia genética, ver Anderson 1992. Ver também WO 93/25673 e as referências citadas neste. Para revisões adicionais de tecnologia de terapia genética, ver Friedmann, Science, 244: 1275-1281 (1989); Anderson, Nature, suplemento do vol. 392, No.. 6679, pág. 25-30 (1998); Verma, Scientific American: 68-84 (1990); e Miller, Nature, 357: 455-460 (1992).

Métodos de rastreio

As terapias eficazes dependem da identificação de agentes eficazes desprovidos de toxicidade significativa. Os anticorpos podem ser rastreados pela afinidade de ligação através de métodos conhecidos na técnica. Por exemplo, podem ser utilizados ensaio de mobilidade em gel, *Western blots*, ensaio de competição por radio-marcação, co-fraccionamento por cromatografia, co-precipitação, ligação cruzada, ELISA, e semelhantes, os quais são descritos em, por exemplo, *Current Protocols in Molecular Biology* (1999) John Wiley & Sons, NY.

Para rastrear inicialmente anticorpos que se liguem ao epítopo desejado em M-CSF (e.g., aqueles que bloqueiam a ligação de RX1, 5H4, MC1 e/ou MC3 a M-CSF), pode ser realizado um ensaio de bloqueio cruzado de rotina tal como aquele descrito em *Antibodies, A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, Ed Harlow e David Lane (1988). Podem também ser utilizados ensaios de rotina de ligação competitiva, nos quais o anticorpo desconhecido é caracterizado pela sua capacidade de inibir a ligação de M-CSF a um anticorpo específico M-CSF como aqui descrito. Podem ser utilizados M-CSF intatos, os seus fragmentos, ou epítomos lineares tal como representado pelos aminoácidos 98-105 de M-CSF da Figura 12, ou aminoácidos 65-73 ou 138-144 da Figura 12 (correspondendo aos epítomos de M-CSF reconhecidos por 5H4 ou MC3). O mapeamento de epítomos é descrito em Champe *et al.*, *J. Biol. Chem.* 270: 1388-1394 (1995).

É contemplado de um modo adicional que os anticorpos são a seguir testados quanto ao seu efeito na osteoclastogénese, após a administração em animais. Os compostos

potencialmente úteis na prevenção ou tratamento de perda óssea associados a metástases cancerígenas podem ser rastreados utilizando vários ensaios. Por exemplo, um antagonista candidato pode ser primeiramente caracterizado num sistema de cultura celular para determinar a sua capacidade de neutralizar M-CSF na indução da osteoclastogênese. Tal sistema pode incluir a co-cultura de osteoblastos da calvária e células de baço de ratinho (Suda *et al.*, Modulation of osteoclast differentiation. *Endocr. Rev.* 13: 66-80, 1992; Martin e Udagawa, Trends Endocrinol. Metab. 9: 6-12, 1998), a co-cultura de linhas celulares de estroma de ratinho (*e.g.*, MC3T3-G2/PA6 e ST2) e células de baço de ratinho (Udagawa *et al.*, Endocrinology 125: 1805-13, 1989), e a co-cultura de células ST2 e células da medula óssea, células mononucleares de sangue periférico ou macrófagos alveolares (Udagawa *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87: 7260-4, 1990; Sasaki *et al.*, Cancer Res. 58: 462-7, 1998; Mancino *et al.*, J. Surg. Res. 100: 18-24, 2001). Na ausência de qualquer antagonista de M-CSF, células multinucleadas formadas em tais co-culturas satisfazem o critério principal de osteoclastos tais como atividade de fosfatase ácida resistente ao tartarato (TRAP, uma enzima característica dos osteoclastos), recetores de calcitonina, p60-STC, recetores de vitronectina, e a capacidade de formar lacunas de reabsorção no osso e discos de dentina. A presença de um antagonista de M-CSF eficaz inibe a formação de tais células multinucleares.

Para além dos sistemas de co-cultura acima, a capacidade de inibição da osteoclastogênese de um anticorpo M-CSF candidato pode ser avaliada num sistema livre de células do estroma ou de osteoblasto. O M-CSF necessário para a osteoclastogênese pode ser fornecido através de co-cultura de células cancerígenas metastáticas (*e.g.*, MDA 231) ou

meio condicionado destas células cancerígenas (Mancino *et al.*, J. Surg. Res. 0: 18-24, 2001) ou através de adição de M-CSF purificado.

A eficácia de um determinado anticorpo M-CSF na prevenção ou tratamento de perda óssea associado a metástases cancerígenas pode também ser testada em qualquer dos sistemas modelo de metástases de osso animal familiar pelos peritos na especialidade. Tais sistemas modelo incluem os que envolvem injeção direta de células tumorais na cavidade medular óssea (Ingall, Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 117: 819-22, 1964; Falasko, Clin. Orthop. 169: 20 7, 1982), na aorta abdominal de rato (Powles *et al.*, Br. J. Cancer 28: 316 21, 1973), na veia lateral de cauda de ratinho ou no ventrículo esquerdo de ratinho (Auguello *et al.*, Cancer Res. 48: 6876 81, 1988). Na ausência de um antagonista de M-CSF eficaz, as metástases osteolíticas do osso formadas a partir de células tumorais injetadas podem ser determinadas através de radiografias (áreas de lesões osteolíticas do osso) ou histologia e imunohistoquímica (osso e tecidos moles). Sasaki *et al.*, Cancer Res. 55: 3551 7, 1995; Yoneda *et al.*, J. Clin. Invest. 99: 2509 17, 1997. Clohisy e Ramnaraine, Orthop Res. 16: 660 6, 1998. Yin *et al.*, J. Clin. Invest. 103: 197 206, 1999. Na presença de um anticorpo M-CSF, podem ser prevenidas metástases osteolíticas do osso, ou inibidas resultando em menos e/ou menores metástases.

Os anticorpos M-CSF da presente descrição podem ser também úteis na prevenção ou tratamento de metástases cancerígenas. A eficácia de um anticorpo M-CSF candidato na prevenção ou tratamento de metástases cancerígenas pode ser rastreada utilizando um modelo humano de invasão de membrana basal amniônica tal como descrito em Filderman *et*

al., Cancer Res 52: 36616, 1992. Além disso, pode também ser utilizado qualquer dos sistemas de modelo animal para metástases de vários tipos de cancro. Tais sistemas modelo incluem, mas não estão limitados a, aqueles descritos em Wenger *et al.*, Clin. Exp. Metastasis 19: 169 73, 2002; Yi *et al.*, Cancer Res. 62: 917 23, 2002; Tsutsumi *et al.*, Cancer Lett 169: 77-85, 2001; Tsingotjidou *et al.*, Anticancer Res. 21: 971 8, 2001; Wakabayashi *et al.*, Oncology 59: 75 80, 2000; Culp e Kogerman, Front Biosci. 3:D672 83, 1998; Runge *et al.*, Invest Radiol. 32: 212 7; Shioda *et al.*, J. Surg. Oncol. 64: 122 6, 1997; Ma *et al.*, Invest Ophthalmol Vis Sci. 37: 2293 301, 1996; Kuruppu *et al.*, J Gastroenterol Hepatol. 11: 26 32, 1996. Na presença de um anticorpo M-CSF eficaz, as metástases cancerígenas podem ser prevenidas, ou inibidas resultando em menos e/ou menores metástases.

A atividade anti-tumoral de um anticorpo M-CSF particular, ou combinação de anticorpos M-CSF, pode ser avaliada *in vivo* utilizando um modelo animal apropriado. Por exemplo, modelos xenogénicos de cancro linfático em que as células humanas de linfoma são introduzidas em animais imunocomprometidos, tais como ratinhos *nude* ou SCID. A eficácia pode ser prevista utilizando ensaios que meçam a inibição de formação tumoral, regressão tumoral ou metástases, e os semelhantes.

Numa variação de um ensaio *in vitro*, a descrição inclui um método compreendendo os passos de (a) contacto de M-CSF imobilizado com um anticorpo candidato e (b) deteção de ligação do anticorpo candidato ao M-CSF. De um modo alternativo, o anticorpo candidato pode ser imobilizado e é detetada a ligação de M-CSF. A imobilização é conseguida utilizando qualquer um dos métodos bem conhecidos na

técnica, incluindo ligação covalente a um suporte, uma esfera, ou uma resina cromatográfica, assim como interação de alta afinidade, não covalente, tais como ligação a anticorpo, ou utilização de ligação estreptavidina/biotina em que o composto imobilizado inclui uma porção de biotina. A detecção de ligação pode ser conseguida (i) utilizando um marcador radioativo no composto que não está imobilizado, (ii) utilizando um marcador fluorescente no composto não imobilizado, (iii) utilizando um anticorpo imuno específico para o composto não imobilizado, (iv) utilizando um marcador no composto não imobilizado que excite um suporte fluorescente ao qual o composto imobilizado está ligado, assim como outras técnicas bem conhecidas e utilizadas frequentemente na técnica.

Os anticorpos que modulam (*i.e.*, aumentam, diminuem, ou bloqueiam) a atividade ou expressão de M-CSF podem ser identificados através de incubação de um suposto modulador com uma célula que expresse M-CSF e determinando o efeito do suposto modulador na atividade ou expressão do M-CSF. A seletividade de um anticorpo que module a atividade de um polipéptido ou polinucleótido M-CSF pode ser avaliada pela comparação dos seus efeitos no polipéptido ou polinucleótido M-CSF com o seu efeito noutros compostos relacionados. Moduladores seletivos podem incluir, por exemplo, anticorpos e outras proteínas, péptidos, ou moléculas orgânicas que se liguem de um modo específico a polipéptidos M-CSF ou a um ácido nucleico que codifique um polipéptido M-CSF. Moduladores de atividade M-CSF serão terapeuticamente úteis no tratamento de doenças e condições fisiológicas nas quais esteja envolvida atividade normal ou aberrante de polipéptido M-CSF.

A descrição compreende também ensaios de Rastreamento de Alto Rendimento (HTS) para identificar anticorpos que interajam

com ou inibam atividade biológica (*i.e.*, inibam atividade enzimática, atividade de ligação, etc.) de um polipéptido M-CSF. Ensaios HTS permitem o rastreamento de um grande número de compostos de um modo eficaz. Os sistemas HTS baseados em células são contemplados para investigar a interação entre polipéptidos M-CSF e os seus parceiros de ligação. Ensaios HTS são designados para identificar "*hits*" ou "compostos líder" que tenham a atividade desejada, a partir dos quais podem ser designadas modificações para melhorar a propriedade desejada. A modificação química do "hit" ou "composto líder" é muitas vezes baseada numa relação estrutura/atividade identificável entre o "hit" e os polipéptidos M-CSF.

Outro aspeto da presente descrição é dirigido a métodos de identificação de anticorpos que modulem (*i.e.*, diminuam) a atividade de um M-CSF compreendendo o contato de M-CSF com um anticorpo, e determinando se o anticorpo modifica a atividade de M-CSF. A atividade na presença do anticorpo teste é comparada com a atividade na ausência do anticorpo teste. Sempre que a atividade da amostra contendo o anticorpo teste seja menor que a atividade na amostra sem o anticorpo teste, o anticorpo terá atividade inibitória.

Está disponível uma variedade de sistemas heterólogos para expressão funcional de polipéptidos recombinantes que são bem conhecidos pelos peritos na especialidade. Tais sistemas incluem bactérias (Strosberg, *et al.*, Trends in Pharmacological Sciences (1992) 13:95-98), leveduras (Pausch, Trends in Biotechnology (1997) 15:487-494), vários tipos de células de inseto (Vanden Broeck, Int. Rev. Cytology (1996) 164:189-268), células de anfíbio (Jayawickreme *et al.*, Current Opinion in Biotechnology (1997) 8: 629-634) e várias linhas celulares de mamífero

(CHO, HEK293, COS, etc.; ver Gerhardt, *et al.*, Eur. J. Pharmacology (1997) 334:1-23). Estes exemplos não excluem a utilização de outros sistemas de expressão celular, incluindo linhas celulares obtidas a partir de nemátodes (pedido de patente PCT WO 98/37177).

Encontram-se também aqui descritos métodos de rastreio de anticorpos que modulem a atividade de M-CSF que compreendem o contato de anticorpos teste com um polipéptido M-CSF e a realização de ensaio para a presença de um complexo entre o anticorpo e o M-CSF. Nestes ensaios, o ligando está de um modo típico marcado. Após incubação apropriada, o ligando livre é separado do presente na forma ligada, e a quantidade de marcador livre ou não complexado é uma medida da capacidade do anticorpo particular se ligar ao M-CSF ou ao polipéptido M-CSFR.

Podem ser utilizados rastreios de alto rendimento para fragmentos ou CDRs de anticorpo contendo afinidade de ligação apropriada para um polipéptido M-CSF. De um modo resumido, grandes números de diferentes compostos teste de pequenos péptidos são sintetizados num substrato sólido. Os anticorpos de péptido teste são postos em contato com um polipéptido M-CSF e lavados. Os polipéptidos M-CSF ligados são então detetados através de métodos bem conhecidos na técnica. Polipéptidos purificados desta descrição podem também ser revestidos de um modo direto em placas para utilização nas técnicas de rastreio de fármacos acima mencionadas. Além disso, podem ser utilizados anticorpos não neutralizantes para capturar a proteína e imobilizá-la no suporte sólido.

Terapia de combinação

Tendo identificado mais do que um anticorpo M-CSF que seja eficaz num modelo animal, pode ser adicionalmente vantajoso misturar um ou mais anticorpos M-CSF para providenciar ainda uma eficácia melhorada contra metástases cancerígenas e/ou perda óssea associada a metástases cancerígenas. Podem ser administradas composições compreendendo um ou mais anticorpos M-CSF em humanos ou mamíferos que sofram de, ou que tenha predisposição para sofrer de, metástases cancerígenas e/ou perda óssea associada a metástases cancerígenas. A administração simultânea de dois agentes terapêuticos não requer que os agentes sejam administrados ao mesmo tempo nem pela mesma via, desde que exista uma sobreposição no período de tempo durante o qual os agentes estejam a exercer o seu efeito terapêutico. É contemplada administração simultânea ou sequencial, assim como administração em diferentes dias ou semanas.

Embora a terapia com anticorpo M-CSF possa ser útil para todos os estádios de cancro, a terapia com anticorpo pode ser particularmente apropriada em cancros avançados ou metastáticos. A combinação do método de terapia com anticorpo com um regime quimioterapêutico ou de radiação pode ser preferida em doentes que não tenham recebido tratamento quimioterapêutico, enquanto que tratamento com a terapia com anticorpo pode ser indicado para doentes que tenham recebido uma ou mais quimioterapias. De um modo adicional, a terapia com anticorpo pode também permitir a utilização de dosagens reduzidas de quimioterapia concomitante, de um modo particular em doentes que não tolerem muito bem a toxicidade do agente quimioterapêutico.

A administração de anticorpos anti-M-CSF simples, assim como combinações, ou "cocktails", de diferentes anticorpos é aqui contemplada. Tais *cocktails* de anticorpos podem ter determinadas vantagens uma vez que estes contêm anticorpos que exploram diferentes mecanismos efetores ou combinam de um modo direto anticorpos citotóxicos com anticorpos que se baseiam em funcionalidade efetora imune. Tais anticorpos em combinação podem exibir efeitos terapêuticos sinérgicos.

A combinação de anticorpo RX1 ou derivado *Human Engineered*TM de RX1 com outras terapêuticas pode ter um efeito num doente que experiencie doença osteoclástica e/ou crescimento tumoral ou metástase. Por exemplo, pode utilizar-se o anticorpo RX1 na produção de um medicamento para o tratamento de um doente que tenha doença osteolítica em que o referido medicamento é coordenado com tratamento utilizando um anticorpo anti-RANKL, recetor RANKL solúvel, outros inibidores RANKL, ou bifosfonatos (e.g., Aredia; Zometa; Clodronato). De um modo alternativo, pode utilizar-se um anticorpo anti-RANKL ou bifosfonato na produção de um medicamento para tratamento de um doente que tenha doença osteolítica em que o referido medicamento seja coordenado com tratamento utilizando anticorpo RX1 ou anticorpo derivado *human engineered* de RX1. A combinação pode também ter um efeito sinérgico no doente tratado. O anticorpo RX1 e outra terapêutica não necessitam ser administrados de um modo simultâneo. RX1 ou a variante *human engineered* e outra terapêutica podem ser administrados num dia, 1 semana, 2 semanas, 4 semanas, 2 meses, 3 meses, 6 meses, 1 ano ou dois anos entre cada um.

Está também contemplada a utilização de um anticorpo RX1 ou anticorpo derivado *human engineered* de RX1 na produção de um medicamento para tratamento de um doente que tenha uma

doença osteolítica em que o referido medicamento é utilizado num doente que tenha sido previamente tratado com um anticorpo anti-RANKL ou bifosfonatos. "Pré-tratamento" significa que um doente foi tratado 2 anos, 1 ano, 6 meses, 3 meses, 2 meses, 1 mês, 2 semanas, 1 semana, ou pelo menos um dia antes de tratamento com RX1 ou variante Human Engineered™ de RX1.

O anticorpo RX1 ou variantes Human Engineered™ podem ser utilizadas em combinação com outras terapêuticas de cancro. Por exemplo, pode utilizar-se anticorpo RX1 ou variantes *human engineered* na produção de um medicamento para tratamento de um doente que tenha doença de cancro em que o referido medicamento é coordenado com tratamento utilizando outros agentes e/ou procedimentos terapêuticos, incluindo mas não limitados a vários agentes quimioterapêuticos, bloqueadores de androgénio, e imunomoduladores (e.g., IL-2, GM-CSF, SLC), Bisfosfonato(s) (e.g., Aredia; Zometa; Clodronato), cirurgia, radiação, quimioterapia citotóxica, terapia hormonal (e.g., Tamoxifeno; terapia anti-Androgénio), terapia de anticorpos (e.g., anticorpos para neutralização de RANKL/RANK; anticorpos para neutralização de PTHrP, anti-Her2, anti-CD20, anti-CD40, CD22, VEGF, IGFR-1, EphA2, HAAH, TMEFF2, CAIX), terapia de proteína terapêutica (e.g., recetor RANKL solúvel; OPG, e inibidores PDGF e MMP), terapias de fármacos de pequenas moléculas (e.g., inibidor Src-cinase), inibidores de cinase de recetores de fatores de crescimento, ou inibidores RANKL, terapia de oligonucleótidos (e.g., Anti-senso RANKL ou RANK ou PTHrP), terapia genética (e.g., inibidores RANKL ou RANK), terapia de péptidos (e.g. muteínas de RANKL) assim como aquelas proteínas, péptidos, compostos, e pequenas moléculas aqui descritas.

O RX1 e variantes Human Engineered™ podem ser utilizados na produção de um medicamento para tratamento de doentes que tenham sido pré-tratados com as terapêuticas acima mencionadas.

Um agente citotóxico refere-se a uma substância que inibe ou previne a função celular e/ou causa da destruição celular. O termo destina-se a incluir isótopos (e.g., I¹³¹, I¹²⁵, Y⁹⁰ e Re¹⁸⁶), agentes quimioterapêuticos, e toxinas tais como toxinas enzimaticamente ativas de origem bacteriana, fúngica, vegetal ou animal ou toxinas sintéticas, ou os seus fragmentos. Um agente não citotóxico refere-se a uma substância que não inibe nem previne a função celular e/ou não causa destruição celular. Um agente não citotóxico pode incluir um agente que pode ser ativado para ser citotóxico. Um agente não citotóxico pode incluir uma esfera, lipossoma, matriz ou partícula (ver, e.g., Publicações de Patente U.S. 2003/0028071 e 2003/0032995). Tais agentes podem ser conjugados, acoplados, ligados ou associados com um anticorpo de acordo com esta descrição. Agentes quimioterapêuticos de cancro incluem, sem limitação, agentes alquilantes, tais como carboplatina e cisplatina; agentes alquilantes de mostarda azotada; agentes alquilantes de nitrosourea, tais como carmustina (BCNU); anti-metabolitos, tais como metotrexato; ácido folínico; anti-metabolitos análogos de purina, mercaptopurina; anti-metabolitos análogos de pirimidina, tais como fluorouracilo (5-FU) e gencitabina (Gemzar®); antineoplásicos hormonais, tais como goserelina, leuprolida, e tamoxifeno; antineoplásicos naturais, tais como aldesleucina, interleucina-2, docetaxel, etoposido (VP-16), interferão alfa, paclitaxel (Taxol®), e tretinoína (ATRA); antineoplásicos naturais antibióticos, tais como bleomicina, dactinomicina, daunorubicina, doxorubicina, daunomicina e mitomicinas incluindo mitomicina C; e

antineoplásicos naturais alcalóides da vinca, tais como vimblastina, vincristina, vindesina; hidroxiureia; aceglatona, adriamicina, ifosfamida, enocitabina, epitiostanol, aclarrubicina, ancitabina, nimustina, hidrocloreto de procarbazona, carboquona, carboplatina, carmofur, cromomicina A3, polissacáridos anti-tumorais, fatores plaquetários anti-tumorais, ciclofosfamida (Cytosin®), esquizofilano, citarabina (arabinósido de citosina), dacarbazina, tioinosina, tiotepa, tegafur, dolastatinas, análogos de dolastatina tais como auri-estatina, CPT-11 (irinotecano), mitoxantrona, vinorelbina, teniposido, aminopterina, carminomicina, esperamicinas (Ver, e.g., Patente U.S. No.. 4 675 187), neocarzinoestatina, OK-432, bleomicina, furtulon, broxuridina, busulfano, honvano, peplomicina, bestatina (Ubenimex®), interferão- β , mepitiostano, mitobronitol, melfalano, péptidos de laminina, lentinano, extrato de *Coriolus versicolor*, tegafur/uracilo, estramustina (estrogénio/mecloretamina).

De um modo adicional, outros agentes utilizados como terapia para doentes com cancro incluem EPO, G-CSF, ganciclovir; antibióticos, leuprolida; meperidina; zidovudina (AZT); interleucinas 1 a 18, incluindo mutantes e análogos; interferões ou citocinas, tais como interferões α , β , e hormonas γ , tais como hormona de libertação de hormona luteinizante (LHRH) e análogos e, hormona libertadora de gonadotrofina (GnRH); fatores de crescimento, tais como fator de crescimento transformante β (TGF- β), fator de crescimento de fibroblasto (FGF), fator de crescimento nervoso (NGF), fator libertador de hormona de crescimento (GHRF), fator de crescimento epidérmico (EGF), fator homólogo de fator de crescimento de fibroblasto (FGFHF), fator de crescimento de hepatócito

(HGF), e fator de crescimento de insulina (IGF); fator de necrose tumoral α & β (TNF- α & β); fator inibidor de invasão (IIF-2); proteínas ósseas morfogenéticas 1-7 (BMP 1-7); somatostatina; timosina- α -1; γ -globulina; superóxido dismutase (SOD); fatores de complemento; fatores anti-angiogênicos; materiais antigênicos; e pró-fármacos.

Pró-fármacos referem-se a um precursor ou forma derivada de uma substância farmacologicamente ativa que é menos citotóxica ou não-citotóxica para as células tumorais comparada com o fármaco parental e é capaz de ser enzimaticamente ativada ou convertida numa forma parental ativa ou mais ativa. Ver, e.g., Wilman, "Prodrugs in Cancer Chemotherapy" *Biochemical Society Transactions*, 14, pág. 375-382, 615^o Meeting Belfast (1986) e Stella et al., "Prodrugs: A Chemical Approach to Targeted Drug Delivery," *Directed Drug Delivery*, Borchardt et al., (ed.), pág. 247-267, Humana Press (1985). Pró-fármacos incluem, mas não estão limitados a, pró-fármacos contendo fosfato, pró-fármacos contendo tiofosfato, pró-fármacos contendo sulfatos, pró-fármacos contendo péptidos, pró-fármacos de D-aminoácidos modificados, pró-fármacos glicosilados, pró-fármacos contendo β -lactama, pró-fármacos contendo fenoxiacetamida opcionalmente substituída ou pró-fármacos contendo fenilacetamida opcionalmente substituída, 5-fluorocitosina e outros pró-fármacos, 5-fluorouridina, os quais podem ser convertidos no fármaco mais ativo livre de citotoxicidade. Exemplos de fármacos citotóxicos que podem ser derivados numa forma de pró-fármaco para esta utilização incluem, mas não estão limitados a, àqueles agentes quimioterapêuticos acima descritos.

Administração e preparação

Os anticorpos anti-M-CSF da invenção podem ser formulados em composições farmacêuticas que compreendem um transportador apropriado para o método de libertação desejado. Transportadores apropriados incluem qualquer material que, quando combinado com os anticorpos anti-M-CSF, mantém a função anti-tumoral do anticorpo e não seja reativo com o sistema imunitário do indivíduo. Exemplos incluem, mas não estão limitados a, qualquer um de um número de transportadores padrão tais como soluções estéreis salinas de tampão fosfato, água bacteriostática, e semelhantes. Pode ser utilizada uma variedade de transportadores aquosos, *e.g.*, água, água tamponada, solução salina a 0,4%, glicina a 0,3% e os semelhantes, e podem incluir outras proteínas para aumento da estabilidade, tais como albumina, lipoproteína, globulina, etc., sujeitas a modificações químicas suaves ou semelhantes.

As formulações terapêuticas do anticorpo são preparadas para armazenamento através de mistura do anticorpo contendo o grau de pureza desejado com transportadores, excipientes ou estabilizadores fisiologicamente aceitáveis (Remington's Pharmaceutical Sciences 16^a edição, Osol, A. Ed. (1980)), sob a forma de formulações liofilizadas ou soluções aquosas. Transportadores, excipientes, ou estabilizadores aceitáveis não são tóxicos para os destinatários nas dosagens e concentrações utilizadas, e incluem tampões tais como fosfato, citrato e outros ácidos orgânicos; antioxidantes incluindo ácido ascórbico e metionina; conservantes (tais como cloreto de octadecildimetilbenzilo amónio; cloreto de hexametónio; cloreto de benzalcónio, cloreto de benzetónio; fenol, álcool butílico ou benzílico;

parabenos de alquilo tais como parabeno de metilo ou propilo; catecol; resorcinol; ciclohexanol; 3-pentanol; e m-cresol); polipéptidos de baixo peso molecular (menos de cerca de 10 resíduos); proteínas, tais como albumina de soro, gelatina, ou imunoglobulinas; polímeros hidrofílicos tais como polivinilpirrolidona; aminoácidos tais como glicina, glutamina, asparagina, histidina, arginina, ou lisina; monossacáridos, dissacáridos, e outros carboidratos incluindo glicose, manose, ou dextrinas; agentes quelantes tais como EDTA; açúcares tais como sacarose, manitol, trealose ou sorbitol; contra-íões formadores de sais tais como sódio; complexos metálicos (e.g., complexos Zn-proteína); e/ou surfactantes não iónicos tais como TWEEN™, PLURONICS™ ou polietileno glicol (PEG).

A formulação presente pode conter também mais do que um composto ativo como requerido para a indicação específica a ser tratada, de um modo preferencial aqueles com atividades complementares que não interfiram um com o outro de um modo adverso. Por exemplo, pode ser desejado providenciar de um modo adicional um agente imunossupressor. Tais moléculas estão presentes de um modo adequado em combinação em quantidades que são eficazes para o propósito pretendido.

Os ingredientes ativos podem também ser capturados em microcápsula preparada, por exemplo, através de técnicas de coacervação ou através de polimerização interfacial, por exemplo, microcápsula de hidroximetilcelulose ou gelatina e microcápsula de poli-(metilmetacilato), respetivamente, em sistemas coloidais de libertação de fármacos (por exemplo, lipossomas, microesferas de albumina, microemulsões, nanopartículas e nanocápsulas) ou em macroemulsões. Tais técnicas são descritas em Remington's Pharmaceutical Sciences 16ª edição, Osol, A. Ed. (1980).

As formulações a ser utilizadas para administração *in vivo* devem ser estéreis. Isto é facilmente conseguido por filtração através de membranas de filtração estéreis.

O anticorpo é administrado através de quaisquer meios apropriados, incluindo administração parenteral, subcutânea, intraperitoneal, intrapulmonar, e intranasal, e, se desejado para tratamento local, intralesional. Infusões parenterais incluem administração intravenosa, intra-arterial, intraperitoneal, intramuscular, intradermal ou subcutânea. Além disso, o anticorpo é administrado de um modo apropriado através de *pulse infusion*, de um modo particular com dosagens declinantes do anticorpo. De um modo preferido o doseamento é dado através de injeções, de um modo mais preferido injeções intravenosas ou subcutâneas, dependendo em parte se a administração é curta ou crônica. São contemplados outros métodos de administração, incluindo administração tópica, de um modo particular transdérmina, transmucosa, rectal, oral ou local e.g. através de um catéter colocado perto do local desejado.

As composições da presente invenção podem estar na forma de, por exemplo, grânulos, pós, comprimidos, cápsulas, xaropes, supositórios, injeções, emulsões, elixires, suspensões ou soluções. As composições instantâneas podem ser formuladas para várias vias de administração, por exemplo, através de administração oral, através de administração nasal, através de administração rectal, injeção subcutânea, injeção intravenosa, injeções intramusculares, ou injeção intraperitoneal. As seguintes formas de dosagem são dadas como exemplo e não devem ser interpretadas como limitantes da invenção imediata.

Para administração oral, bucal, e sublingual, são aceitáveis pós, suspensões, grânulos, comprimidos, pílulas, cápsulas, cápsulas de gel, e *caplets* como formas de dosagem sólidas. Estes podem ser preparados, por exemplo, por mistura de um ou mais compostos da invenção imediata, ou sais farmacologicamente aceitáveis ou seus tautômeros, com pelo menos um aditivo tais como um amido ou outro aditivo. Aditivos apropriados são sacarose, lactose, açúcar, celulose, manitol, maltitol, dextrano, amido, agar, alginatos, quitinas, quitosanos, pectinas, goma tragacanto, goma arábica, gelatinas, colagénios, caseína, albumina, polímeros sintéticos ou semi-sintéticos ou glicéridos. De um modo opcional, formas de dosagem oral podem conter outros ingredientes para auxiliar na administração, tais como um diluente inativo, ou lubrificantes tal como estearato de magnésio, ou conservantes tais como parabeno ou ácido sórbico, ou antioxidantes tais como ácido ascórbico, tocoferol ou cisteína, um agente desintegrante, ligantes, espessantes, tampões, adoçantes, aromatizantes ou agentes perfumantes. Comprimidos e pílulas podem ser adicionalmente tratados com agentes de revestimento apropriados conhecidos na técnica.

As formas de dosagem líquida para administração oral podem estar na forma de emulsões, xaropes, elixires, suspensões, e soluções farmacologicamente aceitáveis, que podem conter um diluente inativo, tal como água. Formulações e medicamentos farmacêuticos podem ser preparados como suspensões ou soluções líquidas utilizando um líquido estéril, tal como, mas não limitado a, um óleo, água, um álcool, e combinação destes. Surfactantes, agentes de suspensão, agentes emulsificantes farmacologicamente apropriados podem ser adicionados para administração oral ou parentérica.

Como assinalado acima, suspensões podem incluir óleos. Tal óleo inclui, mas não está limitado a, óleo de amendoim, óleo de sésamo, óleo de semente de algodão, óleo de milho e azeite. A preparação da suspensão pode também conter ésteres de ácidos gordos tais como oleato de etilo, miristato de isopropilo, glicéridos de ácidos gordos e glicéridos acetilados de ácidos gordos. As formulações de suspensão podem também incluir álcoois, tais como, mas não limitados a, etanol, álcool isopropílico, álcool hexadécilico, glicerol e propilenoglicol. Éteres, tais como mas não limitados a, polietilenoglicol, hidrocarbonetos de petróleo tais como óleo mineral e petrolato; e pode também ser utilizada água nas formulações de suspensão.

Para administração nasal, as formulações e medicamentos farmacêuticos podem ser em *spray* ou aerossol contendo um solvente(s) apropriado(s) e de um modo opcional outros compostos tais como, mas não limitados a, estabilizantes, agentes antimicrobianos, antioxidantes, modificadores de pH, surfactantes, modificadores de biodisponibilidade e combinações destes. Um propelante para uma formulação em aerossol pode incluir ar comprimido, azoto, dióxido de carbono, ou um solvente de baixa ebulição com base hidrocarbono.

Formas de dosagem injetáveis incluem de um modo geral suspensões aquosas ou suspensões em óleo, as quais podem ser preparadas utilizando um dispersante ou humidificante apropriados e um agente de suspensão. Formas injetáveis podem estar em fase de solução ou na forma de uma suspensão, a qual é preparada com um solvente ou diluente. Solventes ou veículos aceitáveis incluem água esterilizada, solução de Ringer, ou uma solução aquosa salina isotónica. De um modo alternativo, podem ser utilizados óleos estéreis como solventes ou agentes de suspensão. De um modo

preferencial, o óleo ou ácido gordo não é volátil, incluindo óleos naturais ou sintéticos, ácidos gordos, mono-, di-, triglicéridos.

Para injeção, a formulação e/ou medicamento farmacêutico pode ser um pó apropriado para reconstituição com uma solução apropriada como descrito acima. Exemplos destes incluem, mas não estão limitados a, pós liofilizados, de secador rotativo ou atomizados, pós amorfos, grânulos, precipitados, ou particulados. Para injeção, as formulações podem opcionalmente conter estabilizantes, modificadores de pH, surfactantes, modificadores de biodisponibilidade e combinações destes.

Para administração rectal, as formulações e medicamentos farmacêuticos podem estar na forma de um supositório, uma pomada, um clister, um comprimido ou um creme para libertação do composto nos intestinos, sigmóide e/ou recto. Os supositórios rectais são preparados através da mistura de um ou mais compostos da invenção imediata, ou sais ou tautómeros farmacêuticamente aceitáveis do composto, com veículos aceitáveis, por exemplo, manteiga de cacau ou polietilenoglicol, os quais estão presentes numa fase sólida a temperaturas de armazenamento normais, e presentes numa fase líquida àquelas temperaturas apropriadas para libertação de uma droga no interior do corpo, tal como no recto. Na preparação das formulações do tipo gelatina mole e supositórios podem também ser utilizados óleos. Podem ser utilizados água, solução salina, dextrose aquosa e soluções de açúcar relacionadas na preparação de formulações em suspensão as quais podem também conter agentes de suspensão tais como pectinas, carbómeros, metilcelulose, hidroxipropilcelulose ou carboximetilcelulose, assim como tampões e conservantes.

Podem ser preparadas preparações de libertação contínua. Exemplos apropriados de preparações de libertação contínua incluem matrizes semi-permeáveis de polímeros hidrofóbicos sólidos contendo o anticorpo, estando as matrizes na forma de produtos com forma, e.g., filmes, ou microcápsulas. Exemplos de matrizes de libertação contínua incluem poliésteres, hidrogéis (por exemplo, poli(2-hidroxietilmetacrilato), ou álcool polivinílico, poliláctidos (Patente U.S. No.. 3 773 919), co-polímeros de ácido L-glutâmico e L-glutamato de etilo, acetato de etileno-vinilo não degradável, co-polímeros degradáveis de ácido láctico-ácido glicólico tais como o Lupron Depot™ (microsféras injetáveis compostas por co-polímeros de ácido láctico-ácido glicólico e acetato de leuprolida), e ácido poli-D-(-)-3-hidroxi-butírico. Enquanto que polímeros tais como acetato de etileno-vinilo e ácido láctico-ácido glicólico permitem libertação de moléculas ao longo de mais de 100 dias, determinados hidrogéis libertam proteínas por períodos de tempo mais curtos. Quando anticorpos encapsulados permanecem no corpo por muito tempo, estes podem desnaturar ou agregar como resultado de exposição à humidade a 37 °C, resultando numa perda de atividade biológica e possíveis alterações na imunogenicidade. Podem ser desenvolvidas estratégias racionais para estabilização dependendo do mecanismo envolvido. Por exemplo, se for descoberto que o mecanismo de agregação é através de formação de ligações S-S intermoleculares por permuta tiol-dissulfeto, pode ser conseguida a estabilização através de modificação de resíduos sulfidrílo, liofilização a partir de soluções acídicas, controlo de humidade, utilização de aditivos apropriados, e desenvolvimento de composições específicas de matrizes de polímeros.

As formulações da descrição podem ser designadas como sendo de atuação rápida, libertação rápida, atuação longa, ou

libertação contínua como aqui descrito. Assim, as formulações farmacêuticas podem também ser formuladas para libertação controlada ou para libertação lenta.

As composições imediatas podem também compreender, por exemplo, micelas ou lipossomas, ou outras formas encapsuladas, ou podem ser administradas numa forma de libertação prolongada de modo a providenciar um armazenamento e/ou efeito de libertação duradouros. Deste modo, as composições e medicamentos farmacêuticos podem ser comprimidos em *pellets* ou cilindros e implantados de modo intramuscular ou subcutâneo como injeções com depósito ou como implantes tais como enxertos. Tais implantes podem utilizar materiais inertes conhecidos tais como silicones e polímeros biodegradáveis.

Para além das formas de dosagem representativas acima descritas, excipientes e transportadores farmacêuticamente aceitáveis são conhecidos de um modo geral pelos peritos na especialidade e são assim incluídos na descrição imediata. Tais excipientes e transportadores são descritos, por exemplo, em "Remingtons Pharmaceutical Sciences" Mack Pub. Co., New Jersey (1991).

Dosagens específicas podem ser ajustadas dependendo das condições de doença, da idade, peso corporal, condições gerais de saúde, sexo, e dieta do indivíduo, intervalos de dose, vias de administração, taxa de excreção, e combinações de fármacos. Qualquer uma das formas de dosagem acima contendo quantidades eficazes encontra-se totalmente contemplada nos limites de experimentação de rotina e deste modo, totalmente dentro do âmbito da descrição imediata.

Anticorpos M-CSF úteis como terapia para metástases cancerígenas ou perda óssea associada a metástases

cancerígenas serão muitas vezes preparados substancialmente livres de outras imunoglobulinas ou outras moléculas biológicas que ocorrem de modo natural. Os anticorpos M-CSF preferidos irão também exibir toxicidade mínima quando administrados num mamífero afetado com, ou predisposto a sofrer de, metástases cancerígenas e/ou perda óssea associada a metástases cancerígenas.

As composições da descrição podem ser esterilizadas através de técnicas de esterilização, convencionais, bem conhecidas. As soluções resultantes podem ser embaladas para uso ou filtradas sob condições assépticas e liofilizadas, sendo a preparação liofilizada combinada com uma solução estéril antes de administração. As composições podem conter substâncias auxiliares farmacologicamente aceitáveis tal como requerido para se assemelharem às condições fisiológicas, tais como ajuste de pH e agentes tamponantes, agentes de ajustamento de tonicidade e semelhantes, por exemplo, acetato de sódio, lactato de sódio, cloreto de sódio, cloreto de potássio, cloreto de cálcio e estabilizantes (e.g., 1 maltose a 20%, etc.).

Os anticorpos M-CSF da descrição podem ser administrados por lipossomas, que são pequenas vesículas compostas por vários tipos de lípidos e/ou fosfolípidos e/ou surfactante os quais são úteis para transporte de um fármaco (tais como os anticorpos aqui descritos e, de um modo opcional, um agente quimioterapêutico). Lipossomas incluem emulsões, espumas, micelas, monocamadas insolúveis, dispersões fosfolipídicas, camadas lamelares e as semelhantes, e podem servir como veículos para direcionar os anticorpos M-CSF para um tecido específico assim como para aumentar o tempo de semivida da composição. Está disponível uma variedade de métodos para preparação de lipossomas, como descrito em, e.g., Patentes U.S. No.s. 4 837 028 e 5 019 369.

Os lipossomas contendo o anticorpo são preparados através de métodos conhecidos na técnica, tal como descrito em Epstein *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82: 3688 (1985); Hwang *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77: 4030 (1980); e Patentes U.S. No.s. 4 485 045 e 4 544 545. Os lipossomas com tempo de circulação aumentado são descritos na Patente U.S. No. 5 013 556. Podem ser gerados lipossomas particularmente úteis através de método de evaporação de fase reversa com uma composição lipídica compreendendo fosfatidilcolina, colesterol e fosfatidiletanolamina derivada de PEG (PEG-PE). Os lipossomas são extrudidos através de filtros de tamanho de poro definido para originar lipossomas com o diâmetro desejado. Fragmentos Fab' do anticorpo da presente descrição podem ser conjugados com os lipossomas como descrito em Martin *et al.*, J. Biol. Chem. 257: 286-288 (1982) através de uma reação de permuta dissulfeto. Um agente quimioterapêutico (tal como Doxorubicina) é opcionalmente encapsulado no lipossoma [ver, *e.g.*, Gabizon *et al.*, J. National Cancer Inst. 81(19): 1484 (1989)].

A concentração do anticorpo M-CSF anticorpo nestas composições pode variar largamente, *i.e.*, desde menos de cerca de 10%, normalmente pelo menos cerca de 25% até tanto como 75% ou 90% por peso e será selecionado primariamente por volumes de fluido, viscosidades, etc., em concordância com o modo particular de administração selecionada. Métodos correntes para preparação de composições administradas por via oral, tópica e parenteral serão conhecidos ou óbvios para os peritos na especialidade e são descritos em detalhe em, por exemplo, Remington's Pharmaceutical Science, 19° ed., Mack Publishing Co., Easton, PA (1995).

Determinação de uma quantidade eficaz de uma composição para tratamento de metástases cancerígenas e/ou perda óssea associada a metástases cancerígenas num doente pode ser conseguida através de métodos empíricos padrão os quais são bem conhecidos na técnica. Por exemplo, a atividade neutralizante *in vivo* de soros de um indivíduo tratado com uma determinada dosagem de anticorpo M-CSF pode ser avaliada utilizando um ensaio que determine a capacidade dos soros bloquearem a proliferação e sobrevivência *in vitro* de monócitos de murino induzidas por M-CSF (célula CD11b+, um subgrupo de células CD1, o qual expressa elevados níveis de recetores para M-CSF) como descrito em Cenci *et al.*, J Clin. Invest. 1055: 1279-87, 2000.

As composições da divulgação são administradas a um mamífero que já sofra de, ou tenha predisposição para, metástases de cancro e/ou perda óssea associada às metástases de cancro numa quantidade suficiente para prevenir ou para pelo menos parar o desenvolvimento das metástases de cancro e/ou perda óssea associada com metástases de cancro. Uma quantidade adequada para alcançar isto é definida como uma "dosagem terapêuticamente eficaz". Quantidades eficazes de um anticorpo M-CSF irão variar e depender da severidade da doença e do peso e estado geral do doente a ser tratado, mas de um modo geral variam entre cerca de 1,0 mg/kg até cerca de 100 mg/kg de peso corporal, ou cerca de 10 mg/kg até cerca de 30 mg/kg, com dosagens de cerca de 0,1 mg/kg até cerca de 10 mg/kg ou cerca de 1 mg/kg até cerca de 10 mg/kg por aplicação sendo os mais utilizadas de modo comum. Por exemplo, cerca de 10 mg/kg a 5 mg/kg ou cerca de 30 mg/kg a 1 mg/kg de anticorpo é uma dosagem candidata inicial para administração a um doente, administrada, por exemplo, através de uma ou mais administrações separadas, ou por infusão contínua. A administração é diária, em dias alternados, semanas ou de

modo menos frequente, como for necessário dependendo da resposta à doença e da tolerância do doente à terapia. Podem ser necessárias dosagens de manutenção ao longo de um período de tempo mais longo, tal como 4, 5, 6, 7, 8, 10 ou 12 semanas ou mais até ocorrer uma supressão desejada dos sintomas da doença, e as dosagens podem ser ajustadas se necessário. O progresso desta terapia é facilmente monitorizado através de técnicas e ensaios convencionais.

Podem ser levadas a cabo administrações únicas ou múltiplas, com os níveis e padrões de dosagem a serem selecionados pelo médico que se encontra a tratar o doente. Para a prevenção ou tratamento da doença, a dosagem apropriada de anticorpo irá depender do tipo de doença a ser tratada, tal como definido acima, da severidade e decorrer da doença, se o anticorpo é administrado com fins preventivos ou terapêuticos, terapias anteriores, a história clínica do doente e resposta ao anticorpo e da discricção do médico assistente. O anticorpo é administrado de modo adequado ao doente de uma vez ou ao longo de uma série de tratamentos.

Em qualquer um dos casos, as formulações devem fornecer uma quantidade de anticorpo M-CSF ao longo do tempo que seja suficiente para prevenir ou minimizar de modo eficaz a severidade das metástases de cancro e/ou perda óssea associada às metástases de cancro. As composições da presente invenção podem ser administradas de modo isolado ou como uma terapia adjunta em conjunto com outras terapias conhecidas no estado da técnica para o tratamento de metástases de cancro e/ou perda óssea associada às metástases de cancro.

A composição de anticorpo irá ser formulada, doseada e administrada de um modo consistente com uma boa prática

médica. Os fatores a ter em consideração neste contexto incluem a desordem particular a ser tratada, o mamífero particular a ser tratado, a condição clínica do doente individual, a causa da desordem, o local de distribuição do agente, o método de administração, os horários de administração e outros fatores conhecidos para os profissionais de saúde. A quantidade terapeuticamente eficaz do anticorpo a ser administrada será governada por tais considerações e é a quantidade mínima para prevenir, melhorar ou tratar a doença, condição ou desordem mediada por M-CSF, de um modo particular para tratar células de cancro e de um modo mais particular para tratar metástases de células tumorais. Tal quantidade é de um modo particular para tratar células de cancro e de um modo mais particular para tratar metástases de células tumorais. Tal quantidade é de um modo preferido abaixo da quantidade que é tóxica para o hospedeiro ou que torna o hospedeiro mais suscetível a infecções.

O anticorpo não precisa de ser, mas de um modo opcional é, formulado com um ou mais agentes utilizados de modo corrente para prevenir ou tratar a desordem em questão. Por exemplo, em cancro o anticorpo pode ser dado em conjunto com um agente quimioterapêutico ou em ADEPT tal como acima descrito. A quantidade eficaz de tais outros agentes depende da quantidade de anticorpo presente na formulação, o tipo de doença, condição ou desordem ou tratamento e outros fatores discutidos acima. Estes são utilizados de um modo geral nas mesmas dosagens e com vias de administração tal como as aqui utilizadas anteriormente ou de cerca de 1 a 99% das dosagens até agora empregues.

Também aqui é descrito um artigo de fabrico contendo materiais úteis para o tratamento de doenças, desordens ou condições acima descritas, incluindo para o tratamento do

cancro. O artigo de fabrico compreende um recipiente e um rótulo. Recipientes adequados incluem, por exemplo, garrafas, frascos, seringas e tubos de teste. Os recipientes podem ser formados a partir de uma variedade de materiais tais como vidro ou plástico. O recipiente comporta uma composição a qual é eficaz para o tratamento da condição e pode ter uma entrada de acesso estéril (por exemplo o recipiente pode ser um saco de solução intravenosa ou um frasco com uma rolha capaz de ser perfurada por uma agulha de injeção hipodérmica). O agente ativo na composição é o anticorpo da invenção. O rótulo no, ou em associação com, o recipiente indica que a composição é utilizada para o tratamento da condição escolhida. O artigo de fabrico pode de um modo adicional compreender um segundo recipiente compreendendo uma solução tampão farmacologicamente aceitável, tal como uma solução salina de tampão fosfato, solução de Ringer e solução de dextrose. Pode ainda incluir outros materiais desejáveis de um ponto de vista comercial e do utilizador, incluindo outras solução tampão, diluentes, filtros, agulhas, seringas e bulas com instruções para uso.

Imunoterapia

Os anticorpos anti-M-CSF úteis no tratamento de doentes com cancro incluem aqueles que são capazes de iniciar uma resposta imunitária potente contra o tumor e aqueles que são capazes de dirigir a citotoxicidade. Neste contexto, os anticorpos anti-M-CSF podem provocar a lise das células tumorais tanto por mecanismos de citotoxicidade celular mediada por complemento ou dependente de anticorpo (ADCC), ambos requerendo uma porção de Fc intacta da molécula de imunoglobulina para interação com os locais recetores do Fc das células efectoras. De um modo adicional, os anticorpos

que exercem um efeito biológico direto no crescimento tumoral são úteis na execução prática desta divulgação. Os mecanismos potenciais através dos quais os tais anticorpos diretamente citotóxicos podem atuar incluem a inibição do crescimento celular, a modulação da diferenciação celular, a modulação dos perfis de fatores de angiogênese tumoral e a indução da apoptose. O mecanismo através do qual um anticorpo anti-M-CSF particular exerce um efeito anti tumoral pode ser avaliado utilizando qualquer número de ensaios *in vitro* desenhados para determinar ADCC, ADMMC, lise celular mediada por complemento e por aí em diante, tal como é de um modo geral conhecido no estado da técnica.

A Imunoterapia pode ser levada a cabo utilizando anticorpos que têm maior afinidade para a forma de M-CSF ligada à membrana (M-CSF α) do que para as formas secretadas de M-CSF. Por exemplo, podem ser preparados anticorpos que se ligam de forma específica no local de clivagem ou em torno deste de M-CSF α ou à porção de M-CSF α adjacente à membrana. Tais anticorpos podem também de um modo benéfico inibir a clivagem e libertação da porção solúvel ativa de M-CSF α .

Os anticorpos anti-M-CSF podem ser administrados na sua forma "nua" ou não conjugada ou podem ter agentes terapêuticos conjugados com eles. Os anticorpos anti-M-CSF podem ser utilizados como radiosensibilizantes. Os anticorpos anti-M-CSF podem ser conjugados com agentes radiosensibilizantes. O termo "radiosensibilizante", tal como aqui utilizado, é definido como uma molécula, de um modo preferido uma molécula de baixo peso molecular, administrada a animais em quantidades terapeuticamente eficazes de forma a aumentar a sensibilidade das células a serem radiosensibilizadas à radiação eletromagnética e/ou para promover o tratamento de doenças que são tratáveis com radiação eletromagnética. As doenças que são tratáveis com

radiação eletromagnética incluem doenças neoplásicas, tumores benignos e malignos e células cancerosas.

Os termos "radiação eletromagnética" e "radiação" tal como aqui utilizados incluem, mas não estão limitados a, radiação com comprimentos de onda de 10-20 até 100 metros. De um modo preferencial, são empregues as radiações eletromagnéticas de: radiação gama (10⁻²⁰ até 10⁻¹³ m), radiação de raio-X (10⁻¹² até 10⁻⁹ m), radiação ultravioleta (10 nm até 400 nm), radiação visível (400 nm até 700 nm), radiação infravermelha (700 nm até 1,0 mm), e radiação microondas (1 mm até 30 cm).

Os radiosensibilizantes são conhecidos por aumentar a sensibilidade de células de cancro aos efeitos tóxicos da radiação eletromagnética. Muitos protocolos de tratamento de cancro empregam de modo corrente radiosensibilizantes ativados pela radiação eletromagnética de raios-X. Exemplos de radiosensibilizantes ativados incluem, mas não estão limitados a, os seguintes: metronidazol, misonidazol, desmetilmisonidazol, pimonidazol, etanidazol, nimorazol, mitomicina C, RSU 1069, SR 4233, E09, RB 6145, nicotinamida, 5-bromodesoxiuridina (BUdR), 5-iododesoxiuridina (IUdR), bromodesoxicidina, fluorodesoxiuridina (FUdR), hidroxiiureia, cisplatina, e análogos terapeuticamente eficazes e derivados do mesmo.

A terapia fotodinâmica (PDT) de cancros emprega luz visível como ativador de radiação do agente sensibilizante. Exemplos de radiosensibilizantes fotodinâmicos incluem os seguintes, mas não estão limitados a: derivados de hematoporfirina, fotofrina(r), derivados de benzoporfirina, NPe6, etioporfirina tin (SnET2), feoborbido-a, bacterioclorofila-a, naftalocianinas, ftalocianinas,

ftalocianinas de zinco, e análogos e derivados de semelhantes terapeuticamente eficazes.

O anticorpo pode ser conjugado com um recetor (tal como estreptavidina) para a utilização na pré-marcação de tumores onde o conjugado anticorpo-recetor é administrado ao doente, seguido de remoção do conjugado não ligado da circulação utilizando um agente de limpeza e administrando depois um ligando (e.g., avidina) o qual é conjugado com um agente citotóxico (e.g., um radionuclídeo).

A presente descrição inclui adicionalmente os anticorpos acima descritos numa forma de identificação detetável. Os anticorpos podem ser identificados de forma detetável através da utilização de radioisótopos, identificadores de afinidade (tais como biotina, avidina etc.), identificadores enzimáticos (tais como peroxidase de rábano silvestre, fosfatase alcalina, etc.), identificadores fluorescentes ou luminescentes ou bioluminescentes (tais como FITC ou rodamina, etc.), átomos paramagnéticos, e semelhantes. Os procedimentos para acompanhar tais marcações são bem conhecidos na técnica; por exemplo, ver (Sternberger, L.A. et al., J. Histochem. Cytochem. 18:315 (1970); Bayer, E.A. et al., Meth. Enzym. 62:308 (1979); Engval, E. et al., Immunol. 109:129 (1972); Goding, J.W. J. Immunol. Meth. 13:215 (1976)).

"Identificador" refere-se a um composto ou composição detetável a qual é conjugado de forma direta ou indireta com o anticorpo. O identificador pode ser ele próprio identificável por si (e.g., identificadores de radioisótopos ou identificadores fluorescentes) ou, no caso de um identificador enzimático, pode catalisar uma alteração química de um composto ou composição de substrato a qual é detetável. De um modo alternativo, o identificador

pode não ser detetável por si mas pode ser um elemento que é ligado por outro agente que é detetável (e.g. um epítopo marcador ou uma parte de um par tal como biotina-avidina, etc.). Deste modo, o anticorpo pode compreender um identificador ou marcador que facilita o seu isolamento, e métodos da descrição para identificar anticorpos incluem um passo de isolamento de M-CSF/anticorpo através de uma interação com o identificador ou marcador.

Imunoconjugados terapêuticos exemplares compreendem o anticorpo aqui descrito conjugado com um agente citotóxico tal como um agente quimioterapêutico, toxina (e.g., uma toxina enzimaticamente ativa de origem bacteriana, fúngica, vegetal ou animal, ou seus fragmentos), ou um isótopo radioativo (*i.e.*, um radioconjugado). As proteínas de fusão são descritas em maior detalhe abaixo.

A produção de imunoconjugados é descrita na Patente U.S. No. 6 306 393. Os imunoconjugados podem ser preparados através da conjugação indireta de um agente terapêutico com um componente de anticorpo. São descritas técnicas gerais em Shih et al., *Int. J. Cancer* 41:832-839 (1988); Shih et al., *Int. J. Cancer* 46:1101-1106 (1990); e Shih et al., *Pat. U.S. No. 5 057 313*. O método geral envolve fazer reagir um componente de anticorpo com uma porção de carboidrato oxidada com um polímero transportador que tem pelo menos uma função amina livre e que é carregado com uma pluralidade de fármaco, toxina, quelante, adenos de boro ou outros agentes terapêuticos. Esta reação resulta numa ligação de base Schiff inicial (imina), a qual pode ser estabilizada através da redução a uma amina secundária para formar o conjugado final.

O polímero transportador é de um modo preferido um aminodextrano ou polipéptido de pelo menos 50 resíduos de

aminoácidos, apesar de também poderem ser utilizados outros polímeros transportadores substancialmente equivalentes. De um modo preferido, o imunoconjugado final é solúvel numa solução aquosa, tal como soro de mamífero, para facilitar a administração e o "targeting" eficaz para utilização na terapia. Deste modo, as funções solubilizantes no polímero transportador irão aumentar a solubilidade do soro do imunoconjugado final. De um modo particular, o aminodextrano irá ser preferido.

O processo de preparação de um imunoconjugado com um transportador de aminodextrano inicia-se de um modo típico com um polímero de dextrano, de um modo vantajoso dextrano de peso molecular médio de cerca de 10 000 - 100 000. O dextrano é colocado a reagir com um agente oxidante para afetar a oxidação controlada de uma porção dos seus anéis de carboidratos para originar grupos aldeído. A oxidação é de um modo conveniente efetuada com reagentes químicos glicolíticos tais como NaIO_4 , de acordo com os procedimentos convencionais.

O dextrano oxidado é então colocado a reagir com uma poliamina, de um modo preferido uma diamina, e de modo mais preferido uma mono- ou polihidrodiamina. Aminas adequadas incluem etilenodiamina, propilenodiamina ou outras diaminas de polimetileno semelhantes, dietilenotriamina ou poliaminas semelhantes, 1,3-diamino-2-hidroxiopropano, ou outras diaminas ou poliaminas hidroxiladas e semelhantes. É utilizado um excesso de amina em relação aos grupos aldeído do dextrano de forma a garantir a conversão substancialmente completa das funções aldeído para grupos de base Schiff.

Um agente redutor, tal como NaBH_4 , NaBH_3CN ou semelhantes, é utilizado para efetivar a estabilização redutora do

intermediário de base Schiff resultante. O aducto resultante pode ser purificado através de passagem por uma coluna de crivagem convencional de forma a remover os dextransos que sofreram ligação cruzada.

Outros métodos convencionais para derivatizar um dextrano para introduzir funções de amina pode também ser utilizado, e.g., reação com brometo de cianogénio, seguido de reação com uma diamina.

O aminodextrano é então colocado a reagir com o derivado de um fármaco, toxina, quelante, imunomodulador, adendo de boro ou outro agente terapêutico a ser carregado em particular, numa forma ativada, de um modo preferido, um derivado de carboxilo ativado, preparado através de meios convencionais, e.g., utilizando diciclohexilcarbodiimida (DCC) ou uma sua variante solúvel em água, para formar um aducto intermediário.

De um modo alternativo, as toxinas de polipéptido tais como a proteína antiviral de uva-de-rato ou cadeia de ricina A, e semelhantes, podem ser associados com aminodextrano através de condensação de glutaraldeído ou através de reação de grupos carboxilo ativados na proteína com amins no aminodextrano.

Agentes quelantes para radiometais ou intensificadores de ressonância magnética são bem conhecidos na técnica. Os típicos são os derivados de ácido etilenodiaminotetraacético (EDTA) e ácido dietilenotriaminopentaacético (DTPA). Estes agentes quelantes têm de um modo típico grupos na cadeia lateral através dos quais o quelante se consegue acoplar a um transportador. Tais grupos incluem, e.g., benzilisotiocianato, através do qual o DTPA ou EDTA se

consegue emparelhar com o grupo amina de um transportador. De um modo alternativo, os grupos carboxilo ou grupos amina num quelante podem ser emparelhados a um transportador através da ativação ou derivatização anterior ao emparelhamento, todos através de meios bem conhecidos.

Os adendos de boro, tais como os carboranos, podem ser fixados aos componentes do anticorpo através de métodos convencionais. Por exemplo, os carboranos podem ser preparados com funções carboxilo ou cadeias laterais pendentes, tal como é bem conhecido no estado da técnica. A fixação de tais carboranos a um transportador, e.g., aminodextrano, pode ser alcançada através da ativação dos grupos carboxilo dos carboranos e condensação com as amins no transportador para produzir um conjugado intermediário. Tais conjugados intermediários são então anexados aos componentes do anticorpo de forma a produzir imunoconjugados terapêuticamente úteis, tal como descrito abaixo.

Pode ser utilizado um transportador de polipéptido em vez de aminodextrano, mas o transportador de polipéptido deve ter pelo menos 50 resíduos de aminoácido na cadeia, preferencialmente 100-5000 resíduos de aminoácido. Pelo menos alguns dos aminoácidos devem ser resíduos de lisina ou resíduos de glutamato ou aspartato. As amins pendentes dos resíduos de lisina e os carboxilatos pendentes de glutamina e aspartato são convenientes para acoplar um fármaco, uma toxina, um imunomodelador, um quelante, um adendo de boro ou outro agente terapêutico. Exemplos de transportadores de polipéptidos adequados incluem polilisina, ácido poliglutâmico, ácido poliaspártico, seus co-polímeros e polímeros mistos destes aminoácidos e outros, e.g., serinas, para conferir as propriedades de

solubilidade desejadas no transportador resultante carregado e imunoconjugado.

A conjugação do conjugado intermediário com o componente de anticorpo é concluída através da oxidação da porção de carboidratos do componente de anticorpo e fazer reagir os carbonilos de aldeído resultantes (e cetona) com os grupos amina que permanecem no transportador após o carregamento com o fármaco, toxina, quelante, imunomodulador, adendo de boro ou outro agente terapêutico. De um modo alternativo, um conjugado intermediário pode ser acoplado a um anticorpo oxidado através de grupos amina que foram introduzidos no conjugado intermediário após ou com o agente terapêutico. A oxidação é concluída de modo conveniente tanto por meio químico, e.g., com NaIO_4 ou outro reagente glicolítico, ou por meio enzimático, e.g., com neuraminidase e galactose oxidase. No caso de um transportador de aminodextrano, nem todas as aminas do aminodextrano são usadas de um modo típico para carregar um agente terapêutico. As aminas remanescentes de aminodextrano condensam com o componente de anticorpo oxidado para formar adutos de base Schiff, os quais são posteriormente estabilizados de modo redutivo, normalmente com um agente redutor de borohidreto.

São utilizados procedimentos análogos para produzir outros imunoconjugados de acordo com a divulgação. Os transportadores de polipéptidos carregados têm de um modo preferencial resíduos livres de lisina a aguardar pela condensação com a porção de carboidratos oxidada de um componente de anticorpo. Os grupos carboxilo no transportador podem, se necessário, ser convertidos em aminas através de, e.g., ativação com DCC e reação com um excesso de uma diamina.

O imunoc conjugado final é purificado utilizando técnicas convencionais, tais como cromatografia por tamanho em Sephacryl S-300 ou cromatografia por afinidade utilizando um ou mais epítomos CD84Hy.

De um modo alternativo, os imunoc conjugados podem ser preparados através da conjugação direta de um componente de anticorpo com um agente terapêutico. O procedimento geral é análogo ao método indireto de conjugação à exceção que o agente terapêutico é anexado de forma direta a um componente de anticorpo oxidado.

Será apreciado que outros agentes terapêuticos possam ser substituídos pelos quelantes aqui descritos. Os peritos na especialidade serão capazes de conceber esquemas de conjugação, sem experimentação desnecessária.

Como uma ilustração adicional, um agente terapêutico pode ser acoplado a uma região dobradiça de um componente de anticorpo reduzido através da formação de uma ponte dissulfito. Por exemplo, os péptidos toxóides tetânicos podem ser construídos com um único resíduo de cisteína que é utilizado para fixar o péptido à componente de anticorpo. Como uma alternativa, tais péptidos podem ser fixados à componente de anticorpo utilizando um ligando cruzado heterobifuncional, tal como proprionato de N-succinil 3-(2-piridilditio) (SPDP). Yu et al., *Int. J. Cancer* 56:244 (1994). As técnicas gerais para tal conjugação são bem conhecidas na técnica. Ver, por exemplo, Wong, *Chemistry Of Protein Conjugation and Cross-Linking* (CRC Press 1991); Upešlaciš et al., "Modification of Antibodies by Chemical Methods," em *Monoclonal Antibodies: Principles and Applications*, Birch et al. (eds.), páginas 187-230 (Wiley-Liss, Inc. 1995); Price, "Production and Characterization of Synthetic Peptide-Derived Antibodies," em *Monoclonal*

Antibodies: Production, Engineering e Clinical Application, Ritter et al. (eds.), páginas 60-84 (Cambridge University Press 1995).

São preparados conjugados do anticorpo e agente citotóxico utilizando uma variedade de agentes proteicos de acoplamento bifuncionais tais como propionato de N-succinimidil-3-(2-piridilditiol) (SPDP), iminotiolano (IT), derivados bifuncionais de imidoésteres (tais como adipimidato de dimetilo HCL), ésteres ativos (tais como suberato de disuccinimidilo), aldeídos (tais como glutaraldeído), compostos bis-azida (tais como hexanodiamina de (p-azidobenzoílo)), derivados bis-diazônio (tais como bis-(p-diazoniobenzoílo)-etilenodiamina), diisocianatos (tais como 2,6-diisocianato de tolueno), e compostos bi-ativos de fluorina (tais como 1,5-difluoro-2,4-dinitrobenzeno). Por exemplo, pode ser preparada uma imunotoxina de ricina como descrito em Vitetta et al., Science 238: 1098 (1987). O ácido 1-isotiocianatobenzil-3-metildietileno triaminapentaacético (MX-DTPA) marcado com carbono 14 é um exemplo de um agente quelante para conjugação de um radionuclíotido a um anticorpo (ver, e.g., WO94/11026).

Como descrito acima, podem ser utilizadas porções de carboidrato na região Fc de um anticorpo para conjugar um agente terapêutico. Contudo, a região Fc pode estar ausente se é utilizado um fragmento de anticorpo como o componente anticorpo do imunoc conjugado. Ainda assim, é possível introduzir uma porção de carboidrato na região variável de cadeia leve de um anticorpo ou fragmento de anticorpo. Ver, por exemplo, Leung et al., J. Immunol. 154:5919 (1995); Hansen et al., U.S. Pat. No. 5 443 953. A porção de

carbohidrato modificada é então utilizada para ligar um agente terapêutico.

Além disso, os peritos na especialidade irão reconhecer numerosas variações possíveis dos métodos de conjugação. Por exemplo, a porção de carbohidrato pode ser utilizada para ligar polietilenoglicol de modo a estender o tempo de semivida de um anticorpo intacto, ou o seu fragmento de ligação ao antigénio, em sangue, linfa, ou outros fluídos extracelulares. Adicionalmente, é possível construir um "imunocjugado divalente" por acoplamento de agentes terapêuticos a uma porção carbohidrato e a um grupo sulfidrilo livre. Este grupo sulfidrilo livre pode estar localizado na região dobradiça do componente do anticorpo.

Proteínas de fusão de anticorpos anti-M-CSF

É aqui descrita a utilização de proteínas de fusão compreendendo uma ou mais porções de anticorpo anti-M-CSF e uma porção imunomoduladora ou toxina. Métodos de produzir proteínas de fusão de anticorpo são bem conhecidos na técnica. Ver, e.g., Patente U.S. No.. 6 306 393. Proteínas de fusão de anticorpo que compreendem uma porção interleucina-2 são descritas por Boleti *et al.*, Ann. Oncol. 6:945 (1995), Nicolet *et al.*, Cancer Gene Ther. 2:161 (1995), Becker *et al.*, Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 93:7826 (1996), Hank *et al.*, Clin. Cancer Res. 2:1951 (1996), e Hu *et al.*, Cancer Res. 56:4998 (1996). De um modo adicional, Yang *et al.*, Hum. Antibodies Hybridomas 6:129 (1995), descrevem uma proteína de fusão que inclui um fragmento F(ab')₂ e uma porção do factor de necrose tumoral alfa.

São também conhecidos pelos peritos na especialidade métodos de produzir proteínas de fusão de anticorpo-toxina

nas quais uma molécula recombinante compreende um ou mais componentes do anticorpo e uma toxina ou agente quimioterapêutico. Por exemplo, proteínas de fusão anticorpo-exotoxina A de *Pseudomonas* foram descritas por Chaudhary *et al.*, *Nature* 339:394 (1989), Brinkmann *et al.*, *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA* 88:8616 (1991), Batra *et al.*, *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA* 89:5867 (1992), Friedman *et al.*, *J. Immunol.* 150:3054 (1993), Wels *et al.*, *Int. J. Can.* 60:137 (1995), Fominaya *et al.*, *J. Biol. Chem.* 271:10560 (1996), Kuan *et al.*, *Biochemistry* 35:2872 (1996), e Schmidt *et al.*, *Int. J. Can.* 65:538 (1996). Proteínas de fusão de anticorpo-toxina contendo uma porção de toxina diftérica foram descritas por Kreitman *et al.*, *Leukemia* 7:553 (1993), Nicholls *et al.*, *J. Biol. Chem.* 268:5302 (1993), Thompson *et al.*, *J. Biol. Chem.* 270:28037 (1995), e Vallera *et al.*, *Blood* 88:2342 (1996). Deonarain *et al.*, *Tumor Targeting* 1:177 (1995), descreveram uma proteína de fusão de anticorpo-toxina contendo uma porção RNase, enquanto que Linardou *et al.*, *Cell Biophys.* 24-25:243 (1994), produziram uma proteína de fusão anticorpo-toxina compreendendo um componente de DNase I. Foi utilizada gelonina como a porção toxina numa proteína de fusão de anticorpo-toxina de Wang *et al.*, Resumos da 209^a ACS National Meeting, Anaheim, Calif., Apr. 2-6, 1995, Parte 1, BIOT005. Como exemplo adicional, Dohlsten *et al.*, *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA* 91:8945 (1994), reportaram uma proteína de fusão de anticorpo-toxina compreendendo enterotoxina A de *Estafilococos*.

As toxinas representativas que são utilizadas de um modo apropriado na preparação de tais conjugados incluem ricina, abrina, ribonuclease, DNase I, enterotoxina A de *Estafilococos*, proteína anti-viral de *Phytolacca americana*, gelonina, toxina diftérica, exotoxina de *Pseudomonas*, e

endotoxina de *Pseudomonas*. Ver, por exemplo, Pastan *et al.*, Cell 47:641 (1986), e Goldenberg, CA-A Cancer Journal for Clinicians 44:43 (1994). Outras toxinas adequadas são conhecidas pelos peritos na especialidade.

Podem também ser utilizados em ADEPT anticorpos como aqui descritos através da conjugação do anticorpo com uma enzima ativadora de pró-fármaco que converta um pró-fármaco (*e.g.*, um agente quimioterapêutico peptídico, Ver W081/01145) num fármaco ativo anticancerígeno. Ver, por exemplo, W088/07378 e Patente U.S. No.. 4 975 278.

O componente enzimático do imunoconjugado útil para ADEPT inclui uma enzima capaz de atuar num pró-fármaco de tal maneira que o converte na sua forma citotóxica, mais ativa.

As enzimas que são úteis no método desta descrição incluem, mas não estão limitadas a, fosfatase alcalina útil na conversão de pró-fármacos contendo fosfato em fármacos livres; arilsulfatase útil na conversão de pró-fármacos contendo sulfato em fármacos livres; desaminase de citosina útil na conversão de 5-fluorocitosina não tóxica no fármaco anticancerígeno, 5-fluorouracilo; proteases, tais como protease de serratia, termolisina, subtilisina, carboxipeptidases e catepsinas (tais como catepsinas B e L), que são úteis na conversão de pró-fármacos contendo péptidos em fármacos livres; D-alanilcarboxipeptidases, úteis na conversão de pró-fármacos que contenham substituintes D-aminoácidos; enzimas que clivem carboidratos tais como β -galactosidade e neuraminidase úteis na conversão de pró-fármacos glicosilados em fármacos livres; β -lactamase útil na conversão de fármacos derivatizados com grupos β -lactâmicos em fármacos livres; e amidases de penicilina, tais como amidase de penicilina V

ou amidase de penicilina G, úteis na conversão de fármacos derivatizados nos azotos de amina com grupos fenoxiacetilo ou fenilacetilo, respetivamente, em fármacos livres. De um modo alternativo, podem ser utilizados anticorpos com atividade enzimática, também conhecidos na técnica como abzimas, para converter os pró-fármacos da descrição em fármacos ativos livres (Ver, e.g., Massey, Nature 328: 457-458 (1987)). Conjugados anticorpo-abzima podem ser preparados como aqui descrito para o transporte do abzima para uma população de células tumorais.

As enzimas desta descrição podem ser ligadas de modo covalente aos anticorpos através de técnicas bem conhecidas na especialidade tais como a utilização dos reagentes de ligação heterobifuncionais discutidos acima. De um modo alternativo, podem ser construídas proteínas de fusão compreendendo pelo menos uma região de ligação ao antigénio de um anticorpo como aqui descrito ligada a pelo menos uma porção funcionalmente ativa de um enzima da descrição utilizando técnicas de DNA recombinante bem conhecidas na especialidade (Ver, e.g., Neuberger et al., Nature 312: 604-608 (1984)).

Utilizações não terapêuticas

Os anticorpos aqui descritos podem ser utilizados como agentes de purificação por afinidade para M-CSF ou em ensaios de diagnóstico para proteína M-CSF, e.g., deteção da sua expressão em células específicas, tecidos, ou soro. Os anticorpos podem também ser utilizados para ensaios de diagnóstico *in vivo*. De um modo geral, para este objetivo o anticorpo é marcado com um radionuclídeo (tal como ^{111}In , ^{99}Tc , ^{14}C , ^{131}I , ^{125}I , ^3H , ^{32}P ou ^{35}S) de modo que o tumor possa ser localizado utilizando imunocintigrafia.

Os anticorpos aqui descritos podem ser utilizados em qualquer método de ensaio conhecido, tal como ensaios competitivos de ligação, ensaios diretos ou indiretos em *sandwich*, tais como ELISAs, e ensaios de imunoprecipitação. Zola, *Monoclonal Antibodies: A Manual of Techniques*, pág. 147-158 (CRC Press, Inc. 1987). Os anticorpos podem também ser utilizados em imunohistoquímica, para marcar amostras tumorais utilizando métodos conhecidos na técnica.

Por uma questão de conveniência, o anticorpo da presente invenção pode ser fornecido num *kit*, *i.e.*, uma combinação embalada de reagentes em quantidades pré-determinadas com instruções para realização do ensaio de diagnóstico. Quando o anticorpo se encontra marcado com uma enzima, o kit incluirá substratos e cofatores necessários à enzima (*e.g.*, um precursor substrato que fornece o cromóforo ou fluorocromo detetáveis). Adicionalmente, podem ser incluídos outros aditivos tais como estabilizadores, soluções tampão (*e.g.*, um tampão de bloqueio ou tampão de lise) e semelhantes. As quantidades relativas dos vários reagentes podem ser modificadas ligeiramente para providenciar concentrações em solução dos reagentes que otimizem substancialmente a sensibilidade do ensaio. De um modo particular, os reagentes podem ser fornecidos como pós secos, normalmente liofilizados, incluindo excipientes os quais em dissolução irão providenciar uma solução de reagentes contendo a concentração apropriada.

A invenção é ilustrada pelos seguintes exemplos, os quais não pretendem ser de modo nenhum limitativos.

EXEMPLOS

EXEMPLO 1

Este exemplo demonstra que anticorpos M-CSF RX1 e 5A1 são específicos da espécie e que anticorpos RX1, MC1, e MC3 neutralizam a atividade de M-CSF humano. RX1 é um anticorpo vendido comercialmente que se encontrava disponível há mais de um ano antes da data de pedido desta patente. Exemplos de fontes comerciais incluem, mas não estão limitados a, clones monoclonais 116, 692, e 21 de anticorpo M-CSF de ratinho anti-humano (Anogen); clones 21113.131, 26730, e 26786 de anticorpo anti-M-CSF humano (R & D Systems, Inc.); e clone M16 de anticorpo anti-M-CSF humano (Antigenix America, Inc.).

Para testar a atividade neutralizante de RX1 e 5A1, foi utilizado um ensaio de proliferação de linha celular M-NFS-60 (American Type Culture Collection No.. de Acesso CRL-1838, disponível na ATCC em Rockville, MD, EUA, derivada de uma leucemia mielogéna induzida com o retrovírus ecotrópico Cas-Br-MuLV isolado de ratinho selvagem, que responde tanto a interleucina 3 como M-CSF e a qual contém um proto-oncogene c-myb truncado causado pela integração de um retrovírus). A proliferação de M-NFS-60 requer M-CSF ativo de um modo dependente da dosagem. No ensaio, células M-NFS-60 são lavadas e colocadas em cultura em meio RPMI 1640 com FBS a 10% e M-CSF a 3000 U/ml e Pen/Strep a 1%. M-CSF humano recombinante (a uma concentração final de 10 ng/ml), específico de humano ou murino, foi incubado com várias concentrações de anticorpos durante 1 hora a 37 °C em CO₂ a 5% numa incubadora. Após a incubação, a mistura foi adicionada a uma cultura M-NFS-60 em placas de microtitulação de 96 poços. O volume total de ensaio por

poço foi 100 μ l, com M-CSF a 10 ng/ml, e a concentração de anticorpo a indicada na Figura 5. As células foram incubadas a 37 °C sob CO₂ a 5% durante 72 horas antes do número de células ser quantificado através de ensaio CellTiter Glo (Promega). O ensaio mencionado acima foi repetido para anticorpos MC3 e MC1.

Tal como apresentado na Figura 5, os anticorpos M-CSF RX1 e 5A1 são específicos da espécie. A proliferação celular encontra-se apresentada como a leitura de fluorescência do ensaio CellTiter Glo, a qual é linearmente proporcional ao número de células. A atividade neutralizante específica de espécie de RX1 e 5A1 é apresentada pela sua capacidade de inibir M-NFS-60 na presença de M-CSF quer humano quer murino. Finalmente, como apresentado na Figura 5B, anticorpos MC3 e MC1 são também inibidores eficazes de atividade de M-CSF.

EXEMPLO 2

Este exemplo demonstra que o anticorpo RX1 inibe de um modo eficaz a osteólise num modelo xenográfico humano numa dose de 5mg/kg. Foram utilizados neste estudo ratinhos *nude* fêmea com uma idade de 4-7 semanas, peso médio ~20g. Células tumorais (MDAMB-231, 3×10^5) em suspensão em 10 μ l de solução salina foram injetadas na cavidade medular óssea da tíbia direita. Foram retiradas radiografias das patas posteriores um dia após a inoculação com o tumor de modo a obter a imagem de linha de base e verificar se houve fratura óssea causada pela injeção. Os ratinhos foram colocados ao acaso em grupos de tratamento de 10 ratinhos por grupo incluindo PBS e RX1 a 5 mg/kg, injetados i.p. uma vez por semana durante 6 semanas. No final do estudo, foram efetuadas novamente radiografias das patas posteriores e

comparadas à linha de base quanto à danificação óssea. O grau de danificação óssea causada pelo tumor foi definido como apresentado na Figura 6. O grupo sujeito a tratamento RX1 a 5 mg/kg apresentou proteção do osso estatisticamente significativa da danificação causada pelo tumor.

EXEMPLO 3

Este exemplo demonstra que o número de metástases é reduzido quando é administrado anticorpo RX1 a uma concentração de 5 mg/kg em ratinhos *nude* MDA-MB-231 com cancro da mama humano.

Foram utilizados neste estudo ratinhos *nude* fêmea com uma idade de 4-7 semanas, peso médio de ~20g. As células tumorais (MDAMB-231, 3×10^5) em suspensão em 10 μ l de solução salina foram injetadas na cavidade medular óssea da tíbia direita. Foram retiradas radiografias das patas posteriores um dia após a inoculação com o tumor de modo a obter a imagem de linha de base e verificar se houve fratura óssea causada pela injeção. Os ratinhos foram colocados ao acaso em grupos de tratamento de 10 ratinhos por grupo incluindo PBS e RX1 a 5 mg/kg, injetados i.p. uma vez por semana durante 6 semanas. No final do estudo, foram recolhidos os pulmões de cada grupo de tratamento e fixos em solução de Bouin para contagem de nódulos pulmonares metastáticos.

Como apresentado na Figura 7, o número de metástases é reduzido quando é administrado anticorpo RX1 a uma concentração de 5 mg/kg em ratinhos *nude* MDA-MB-231 com cancro da mama humano.

EXEMPLO 4

Este exemplo define um procedimento para humanização do anticorpo RX1. 5H4, MC1 e MC3 são humanizados utilizando procedimentos semelhantes.

Desenho de genes para cadeias leves e pesadas humanizadas de RX1

A sequência de nucleótidos e aminoácidos para RX1 de murino está descrita na Figura 4B. A sequência de um anticorpo humano identificada utilizando a *National Biomedical Foundation Protein Identification Resource* ou base de dados semelhante é utilizada para obter a estrutura do anticorpo humanizado. Para selecionar a sequência da cadeia pesada humanizada, a sequência de cadeia pesada de RX1 de murino é alinhada com a sequência da cadeia pesada do anticorpo humano. A cada posição, o aminoácido do anticorpo humano é selecionado para a sequência humanizada, a menos que a posição se encontre em qualquer uma das seguintes categorias definidas abaixo, e nesse caso é selecionado o aminoácido de RX1 de murino:

(1) A posição se encontre na região determinante de complementaridade (CDR), como definido por Kabat, J. *Immunol.*, 125, 961-969 (1980);

(2) O aminoácido do anticorpo humano é raro nas cadeias pesadas humanas nessa posição, enquanto que o aminoácido de RX1 de murino é comum nas cadeias pesadas humanas nessa posição;

(3) A posição é imediatamente adjacente a uma CDR na sequência de aminoácidos da cadeia pesada de RX1 de murino;

ou

(4) Modelagem tridimensional do anticorpo RX1 de murino sugere que o aminoácido está fisicamente perto da região de ligação ao antigénio.

Para selecionar a sequência da cadeia leve humanizada, a sequência de cadeia leve de RX1 de murino é alinhada com a sequência de cadeia leve do anticorpo humano. O aminoácido do anticorpo humano é selecionado a cada posição para a sequência humanizada, a não ser que a posição se encontre novamente numa das seguintes categorias descritas acima e repetidas abaixo:

(1) CDR's;

(2) aminoácido de RX1 de murino mais frequente do que anticorpo humano;

(3) Adjacente a CDR's; ou

(4) Possível proximidade tridimensional da região de ligação.

A sequência real de nucleótidos dos genes de cadeia pesada e leve é selecionada como se segue:

(1) As sequências de nucleótidos codificam para as sequências de aminoácidos selecionadas como acima descrito;

(2) A 5' destas sequências codificantes, as sequências de nucleótidos codificam para uma sequência líder (sinal). Estas sequências líder foram selecionadas como é típico para anticorpos;

(3) A 3' das sequências codificantes, as sequências de nucleótidos são as sequências que seguem o segmento J5 da cadeia leve de ratinho e o segmento J2 da cadeia pesada de ratinho, as quais são parte da sequência de RX1 de murino. Estas sequências são incluídas porque contêm sinais de doador de splice; e

(4) Em cada extremidade da sequência está um local Xba I de modo a permitir a clivagem nos locais XbaI e a clonagem no local Xba I de um vetor.

Construção de genes de cadeias leve e pesada humanizadas

Para sintetizar a cadeia pesada, são sintetizados quatro oligonucleótidos utilizando um sintetizador de DNA Applied Biosystems 380B. Dois dos oligonucleótidos são parte de cada cadeia da cadeia pesada, e cada oligonucleótido está sobreposto com o próximo em cerca de 20 nucleótidos para permitir a hibridação. Em conjunto, os oligonucleótidos cobrem toda a região variável da cadeia pesada humanizada com alguns nucleótidos extra em cada extremidade para permitir a clivagem nos locais Xba I. Os oligonucleótidos são purificados em géis de poliacrilamida.

Cada oligonucleótido é fosforilado utilizando ATP e cinase de polinucleótido do T4 através de procedimentos padrão (Maniatis *et al.*, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2ª ed., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y. (1989)). Para hibridar os oligonucleótidos fosforilados, estes são ambos colocados em suspensão em 40 µl de TA (Tris acetato a 33 mM, pH 7,9, acetato de potássio a 66 mM, acetato de magnésio a 10 mM) a uma concentração de cerca de 3,75 µM cada um, aquecidos a 95 °C durante 4 minutos e arrefecidos lentamente até 4 °C. Para sintetizar

o gene completo a partir dos oligonucleótidos através de síntese de cadeias opostas de cada oligonucleótido, são adicionados os seguintes componentes num volume final de 100 μL :

10 μl dos oligonucleótidos hibridados
0,16 mM de cada desoxirribonucleótido
ATP a 0,5 mM
DTT a 0,5 mM
BSA a 100 $\mu\text{g/ml}$
proteína g43 de T4 (DNA polimerase) a 3,5 $\mu\text{g/ml}$
proteína g44/62 de T4 (proteína acessória da polimerase)
a 25 $\mu\text{g/ml}$
proteína 45 (proteína acessória da polimerase) a 25
 $\mu\text{g/ml}$

A mistura é incubada a 37 °C durante 30 min. Depois 10 U de DNA ligase de T4 são adicionadas e a incubação a 37 °C é recomeçada durante 30 min. A polimerase e ligase são inativadas por incubação da reação a 70 °C durante 15 min. Para clivar o gene com Xba I, são adicionados à reação 50 μl de TA 2x concentrado contendo BSA a 200 $\mu\text{g/ml}$ e DTT a 1 mM, 43 μl de água e 50 U de Xba I em 5 μl . A reação é incubada durante 3 h a 37 °C, e depois purificada num gel. O fragmento Xba I é purificado a partir do gel e clonado no local Xba I do plasmídeo pUC19 através de métodos padrão. Os plasmídeos são purificados utilizando técnicas padrão e sequenciados utilizando o método didesoxi.

A construção de plasmídeos que expressem cadeias leve e pesada é conseguida através do isolamento de fragmentos Xba I de cadeia leve e pesada a partir do plasmídeo pUC19 no qual estes tinham sido inseridos e inserindo posteriormente

os mesmos no local Xba I de um vetor de expressão apropriado o qual irá expressar elevados níveis de uma cadeia pesada completa quando transfetado na célula hospedeira apropriada.

Síntese e afinidade de anticorpo humanizado

Os vetores de expressão são transfectados em células Sp2/0 de ratinho, e células que integrem os plasmídeos são selecionadas através de métodos padrão com base no(s) marcador(es) seletivo(s) conferido(s) pelos vetores de expressão. Para verificar que estas células produziram anticorpo que se liga a M-CSF, os sobrenadantes destas células são incubados com células que são conhecidas por expressar M-CSF. Após lavagem, as células são incubadas com anticorpo de cabra anti-humano conjugado com fluoresceína, lavadas, e analisadas por fluorescência num citofluorômetro FACSCAN.

Para as próximas experiências, as células que produzem o anticorpo humanizado são injetadas em ratinhos, e as ascites resultantes são recolhidas. O anticorpo humanizado é purificado até homogeneização substancial a partir das ascites através de passagem por uma coluna de afinidade de anticorpo de cabra anti-imunoglobulina humana, preparado num suporte Affigel-10 (Bio-Rad Laboratories, Inc., Richmond, Calif.) de acordo com técnicas padrão. Para determinar a afinidade do anticorpo humanizado relativamente ao anticorpo RX1 original de murino, é realizada uma experiência de ligação competitiva de acordo com técnicas conhecidas na especialidade.

EXEMPLO 4A

Este exemplo descreve a clonagem e expressão de anticorpos RX1 Human Engineered™, assim como a purificação destes anticorpos e o teste quanto à atividade de ligação. Os anticorpos 5H4, MC1, e MC3 Human Engineered™ são preparados utilizando procedimentos semelhantes.

Desenho de sequências Human Engineered™

Foi descrito Human Engineering™ de domínios variáveis de anticorpo por Studnicka [Ver, e.g., Studnicka et al. Patente U.S. No.. 5 766 886; Studnicka et al. Protein Engineering 7: 805-814 (1994)] como um método de redução de imunogenicidade que mantém a atividade de ligação de moléculas de anticorpo. De acordo com o método, a cada aminoácido da região variável foi atribuído um risco de substituição. As substituições de aminoácido são distinguidas por uma de três categorias de risco: (1) alterações de risco baixo são aqueles que têm o maior potencial de reduzir a imunogenicidade com a menor probabilidade de destruírem a ligação ao antigénio; (2) alterações de risco moderado são aquelas que adicionalmente poderiam reduzir a imunogenicidade, mas que têm uma maior probabilidade de afetar a ligação ao antigénio ou o enovelamento da proteína; (3) resíduos de risco elevado são aqueles que são importantes na ligação ou na manutenção da estrutura do anticorpo e têm o risco mais elevado de afetarem a ligação ao antigénio ou o enovelamento da proteína. Devido ao papel estrutural tri-dimensional de prolínas, alterações nas prolínas são consideradas de um modo geral alterações de pelo menos risco moderado, mesmo que a posição esteja tipicamente numa posição de risco baixo. As alterações de substituição são preferidas mas também são possíveis inserções e deleções. As figuras 4B e

4C apresentam a atribuição de risco para cada resíduo de aminoácido das cadeias leve e pesada de RX1 de murino, respectivamente, categorizadas como alteração de alto, moderado ou risco baixo.

Regiões variáveis das cadeia leve e pesada do anticorpo RX1 de murino foram Human Engineered™ utilizando este método. Foram identificados resíduos de aminoácidos em posições de risco baixo que são candidatos a alteração de acordo com o método através de alinhamento de sequências de aminoácidos de regiões variáveis de murino com uma sequência de região variável humana. Qualquer região variável humana pode ser utilizada, incluindo uma sequência individual VH ou VL ou uma sequência consenso VH ou VL humana. Os resíduos de aminoácidos em qualquer número nas posições de risco baixo, ou na totalidade nas posições de risco baixo, podem ser alterados. Para a sequência de cadeia pesada de "risco baixo" Human Engineered™ nas Figuras 19A-B, foi utilizado como molde a sequência consenso Vh2 humana (baseada em Kabat), e para cada posição em que os resíduos de aminoácido de murino e de humano diferiram em posições de risco baixo, foi introduzida uma alteração de aminoácido que substituiu o resíduo de murino pelo resíduo de humano. Para a sequência de cadeia leve de "risco baixo" Human Engineered™ nas Figuras 20A-B, foi utilizado como molde a sequência consenso kappa 3 humana (baseada em Kabat), e para cada posição em que os resíduos de aminoácido de murino e de humano diferiram em posições de risco baixo, foi introduzida uma alteração de aminoácido que substituiu o resíduo de murino pelo resíduo de humano. Um total de 16 alterações de aminoácido de risco baixo foram efetuadas na cadeia leve e 8 alterações de risco baixo foram efetuadas na cadeia pesada.

De um modo semelhante, foram identificados resíduos de aminoácido que são candidatos a alteração de acordo com o método de posições de baixo e risco moderado através de alinhamento das sequências de aminoácido de regiões variáveis de murino com a sequência de região variável humana. Os resíduos de aminoácidos em qualquer número nas posições de baixo ou moderado risco, ou na totalidade nas posições de baixo ou moderado risco, podem ser alterados. Para a sequência de cadeia pesada Human Engineered™ nas Figuras 19A-B, foi utilizado como molde a sequência consenso Vh2 humana (baseada em Kabat), e para cada posição em que os resíduos de aminoácido de murino e de humano diferiram em posições de baixo ou moderado risco, foi introduzida uma alteração de aminoácido que substituiu o resíduo de murino pelo resíduo de humano. Para a sequência de cadeia leve Human Engineered™ nas Figuras 20A-B, foi utilizado como molde a sequência consenso kappa 3 humana (baseada em Kabat), e para cada posição em que os resíduos de aminoácido de murino e de humano diferiram em posições de baixo ou moderado risco, foi introduzida uma alteração de aminoácido que substituiu o resíduo de murino pelo resíduo de humano. Um total de 19 alterações de aminoácido de baixo e moderado risco foram efetuadas na cadeia leve e 12 alterações de baixo e moderado risco foram efetuadas na cadeia pesada.

Foi também preparada uma sequência de cadeia leve de "risco baixo alternativo" como apresentado nas Figuras 21A-B, na qual a alteração na posição 54 foi revertida para a de murino. Foi também preparada uma sequência de cadeia leve de "risco baixo + moderado alternativo" como apresentado nas Figuras 21A-B, na qual as alterações nas posições 54-56 foram revertidas para as de murino.

Finalmente, foi também produzida uma sequência Human Engineered™ da região V da cadeia leve de "risco baixo + moderado" utilizando o subgrupo 2-1-(1) A14 de linha germinal humana VK6 como molde, como apresentado nas Figuras 22A-B.

Também contemplada na presente invenção está a conservação dos aminoácidos 41-43 (NGS) da Figura 4A os quais representam o local de glicosilação. De um modo alternativo, apenas um ou dois aminoácidos 41-43 (e.g., NG) podem ser conservados.

Preparação de Vetores de Expressão para Desenvolvimento de Linha Celular Permanente

Foram construídos fragmentos de DNA utilizando síntese de nucleótidos sintéticos que codificam cada uma das sequências da região V das cadeias pesada e leve acima descritas assim como sequências sinal derivadas de anticorpo. Foram inseridos DNAs que codificam cada uma das sequências de aminoácidos da região V da cadeia leve no vetor pMXP10 contendo a região constante de cadeia leve Kappa humana. Foram inseridos DNAs que codificam cada uma das sequências de aminoácidos da região V da cadeia pesada no vetor pMXP6 contendo a região constante de cadeia pesada Gamma-2 humana. Foram construídos vetores adicionais contendo sequências de aminoácidos da região V da cadeia pesada em fusão com as regiões constantes Gamma-1 (cDNA) e Gamma-4 (cDNA e genómico) humanas contendo as sequências apresentadas nas figuras 29A, 29b, e 30. Todos estes vetores contêm um promotor hCMV e uma região 3' não traduzida de cadeia leve kappa de ratinho assim como genes de marcadores seletivo tais como *neo* ou *his* para seleção de transfectantes resistentes a *G418* - ou histidinol -,

respetivamente. Os vetores de cadeias leve e pesada estão descritos nas Tabelas 2 e 3, respetivamente.

Tabela 2. Vetores permanentes de cadeia leve Kappa com um único gene

Plasmídeo	Região V	Marcador seletivo
pMXC5	Risco Baixo + Mod (Kabat)	neo
pMXC6	Risco Baixo (Kabat)	neo
pMXC13	Risco Baixo (Kabat) - R54 a S	neo
pMXC14	Risco Baixo + Mod (Kabat) - RAT54,55,56 a SIS	neo
pMXC22	Risco Baixo + Mod (Linha germinal)	neo

Tabela 3. Vetores permanentes de cadeia pesada com um único gene

Plasmídeo	Região V	Região C	Marcador seletivo
pMXC7	Risco Baixo + Mod (Kabat)	Gamma 2	neo
pMXC8	Risco Baixo (Kabat)	Gamma 2	neo
pMXC40	Risco Baixo (Kabat)	Gamma 1	neo
pMXC41	Risco Baixo + Mod (Kabat)	Gamma 1	neo
pMXC45	Risco Baixo + Mod (Kabat)	Gamma 4 (genómico)	neo
pMXC46	Risco Baixo + Mod (Kabat)	Gamma 4 (cDNA)	Neo

Foram posteriormente construídos vetores compreendendo os genes Human Engineered™ de cadeia leve e pesada (Gamma-1, Gamma-2 e Gamma-4). Estes vetores de "2 Genes" contêm genes que codificam cada cadeia de anticorpo, pesada e leve, sob o controlo do promotor hCMV, dador de splice CMV, aceitador de splice 16S do SV40 e o DNA 3' não traduzido da cadeia

leve kappa de ratinho que inclui a cauda poliA. Estes contêm também um marcador seletivo tal como *neo* ou *his* e o gene de resistência à ampicilina. Os vetores que contêm ambas os genes de cadeia pesada e leve estão descritos na Tabela 4. Podem também ser construídos vetores compreendendo duas cópias de cada um dos genes de cadeia leve e pesada (vetores com quatro genes).

Tabela 4. Vetores de expressão permanente com dois genes.

Plasmídeo	Cadeia leve Kappa	Cadeia pesada		Marcador Seletivo
		Região V	Região C	
pMXC12	Risco Baixo (Kabat)	Risco Baixo (Kabat)	Gamma 2	<i>neo</i>
pMXC37	Risco Baixo (Kabat)	Risco Baixo (Kabat)	Gamma 2	<i>his</i>
pMXC9	Risco Baixo + Mod (Kabat)	Risco Baixo + Mod (Kabat)	Gamma 2	<i>neo</i>
pMXC16	Risco Baixo (Kabat)	Risco Baixo + Mod (Kabat)	Gamma 2	<i>neo</i>
pMXC17	Risco Baixo + Mod (Kabat)	Risco Baixo (Kabat)	Gamma 2	<i>neo</i>
pMXC18	Risco Baixo (Kabat) - R54 a S	Risco Baixo + Mod (Kabat)	Gamma 2	<i>neo</i>
pMXC19	Risco Baixo + Mod(Kabat) - RAT54,55,56 a SIS	Risco Baixo + Mod (Kabat)	Gamma 2	<i>neo</i>
pMXC20	Risco Baixo (Kabat) - R54 a S	Risco Baixo (Kabat)	Gamma 2	<i>neo</i>

pMXC21	Risco Baixo + Mod (Kabat) - RAT54,55,56 a SIS	Risco Baixo (Kabat)	Gamma 2	<i>neo</i>
pMXC25	Risco Baixo + Mod (Linha germinal)	Risco Baixo + Mod (Kabat)	Gamma 2	<i>neo</i>
pMXC47	Risco Baixo + Mod (Linha germinal)	Risco Baixo + Mod (Kabat)	Gamma 2	<i>his</i>
pMXC26	Risco Baixo + Mod (Linha germinal)	Risco Baixo (Kabat)	Gamma 2	<i>neo</i>
pMXC42	Risco Baixo + Mod (Linha germinal)	Risco Baixo (Kabat)	Gamma 1	<i>neo</i>
pMXC43	Risco Baixo + Mod (Linha germinal)	Risco Baixo + Mod (Kabat)	Gamma 1	<i>neo</i>
pMXC50	Risco Baixo + Mod (Linha germinal)	Risco Baixo + Mod (Kabat)	Gamma 1	<i>his</i>
pMXC48	Risco Baixo + Mod (Linha germinal)	Risco Baixo + Mod (Kabat)	Gamma 4 (cDNA)	<i>Neo</i>
pMXC49	Risco Baixo + Mod (Linha germinal)	Risco Baixo + Mod (Kabat)	Gamma 4 (genómico o)	<i>Neo</i>

Preparação de Vetores de Expressão para Expressão Transiente

Foram construídos vetores contendo quer os genes de cadeia leve quer pesada para transfeção transiente. Estes vetores são semelhantes àqueles descritos acima para transfeções permanentes com a exceção de que em vez de conterem os genes *neo* ou *his*, estes contêm a *oriP* do vírus Epstein-Barr para replicação em células HEK293 que expressam o antigénio nuclear do vírus Epstein-Barr. Os vetores para transfeção transiente estão descritos nas Tabelas 5 e 6.

Tabela 5. Vetores transientes de cadeia leve Kappa.

Plasmídeo	Região V
pMXC1	Risco Baixo + Mod (Kabat)
pMXC2	Risco Baixo (Kabat)
pMXC10	Risco Baixo+ Mod (Kabat) - RAT54,55,56 a SIS
pMXC11	Risco Baixo (Kabat) - R54 a S
pMXC15	Risco Baixo + Mod (Linha germinal)

Tabela 6. Vetores transientes de cadeia pesada.

Plasmídeo	Região V	Região C
pMXC3	Risco Baixo + Mod (Kabat)	Gamma 2
pMXC4	Risco Baixo (Kabat)	Gamma 2
pMXC29	Risco Baixo (Kabat)	Gamma 1
pMXC38	Risco Baixo (Kabat)	Gamma 4 (genómico)
pMXC39	Risco Baixo + Mod (Kabat)	Gamma 1

Expressão Transiente de RX1 Human-Engineered em Células HEK293E

Foram transfectados os vetores distintos cada um contendo *oriP* do vírus Epstein-Barr e os genes de cadeia leve ou pesada descritos acima de modo transiente em células HEK293E. As células transfectadas de modo transiente foram incubadas até 10 dias após os quais o sobrenadante foi recolhido e o anticorpo purificado utilizando cromatografia de Proteína A. As proteínas produzidas pela transfeção transiente de células 293E estão descritas na Tabela 7 abaixo.

Tabela 7. Anticorpos RX1 human-engineered preparados.

<u>Anticorpo</u>	<u>Cadeia levada</u>		<u>Cadeia pesada</u>	
	<u>Plasmídeo</u>	<u>Proteína</u>	<u>Plasmídeo</u>	<u>Proteína</u>
<u>heRX1-1.G2</u>	<u>pMXC2</u>	<u>Risco Baixo</u> <u>(Kabat)</u>	<u>pMXC4</u>	<u>Risco</u> <u>Baixo</u> <u>(Kabat)</u>
<u>heRX1-2.G2</u>	<u>pMXC2</u>	<u>Risco Baixo</u> <u>(Kabat)</u>	<u>pMXC3</u>	<u>Risco</u> <u>Baixo +</u> <u>Mod</u> <u>(Kabat)</u>
<u>heRX1-3.G2</u>	<u>pMXC1</u>	<u>Risco Baixo</u> <u>+ Mod</u> <u>(Kabat)</u>	<u>pMXC4</u>	<u>Risco</u> <u>Baixo</u> <u>(Kabat)</u>
<u>heRX1-4.G2</u>	<u>pMXC1</u>	<u>Risco Baixo</u> <u>+ Mod</u> <u>(Kabat)</u>	<u>pMXC3</u>	<u>Risco</u> <u>Baixo +</u> <u>Mod</u> <u>(Kabat)</u>
<u>heRX1-5.G2</u>	<u>pMXC11</u>	<u>Risco Baixo</u> <u>(Kabat) -</u>	<u>pMXC4</u>	<u>Risco</u> <u>Baixo</u>

		<u>R54 a S</u>		<u>(Kabat)</u>
<u>heRX1-6.G2</u>	<u>pMXC11</u>	<u>Risco Baixo</u> <u>(Kabat) -</u> <u>R54 a S</u>	<u>pMXC4</u>	<u>Risco</u> <u>Baixo</u> <u>(Kabat)</u>
<u>heRX1-7.G2</u>	<u>pMXC10</u>	<u>Risco Baixo</u> <u>+ Mod(Kabat)</u> <u>=</u> <u>RAT54,55,56</u> <u>a SIS</u>	<u>pMXC4</u>	<u>Risco</u> <u>Baixo</u> <u>(Kabat)</u>
<u>heRX1-8.G2</u>	<u>pMXC10</u>	<u>Risco Baixo</u> <u>+ Mod(Kabat)</u> <u>=</u> <u>RAT54,55,56</u> <u>a SIS</u>	<u>pMXC3</u>	<u>Risco</u> <u>Baixo +</u> <u>Mod</u> <u>(Kabat)</u>
<u>heRX1-9.G2</u>	<u>pMXC15</u>	<u>Risco Baixo</u> <u>+ Mod (Linha</u> <u>germinal)</u>	<u>pMXC4</u>	<u>Risco</u> <u>Baixo</u> <u>(Kabat)</u>
<u>heRX1-</u> <u>10.G2</u>	<u>pMXC15</u>	<u>Risco Baixo</u> <u>+ Mod (Linha</u> <u>germinal)</u>	<u>pMXC3</u>	<u>Risco</u> <u>Baixo</u> <u>(Kabat)</u>
<u>heRX1-1.G1</u>	<u>pMXC2</u>	<u>Risco Baixo</u> <u>(Linha</u> <u>germinal)</u>	<u>pMXC29</u>	<u>Risco</u> <u>Baixo</u> <u>(Kabat)</u>
<u>heRX1-</u> <u>10.G2</u>	<u>pMXC15</u>	<u>Risco Baixo</u> <u>+ Mod (Linha</u> <u>germinal)</u>	<u>pMXC39</u>	<u>Risco</u> <u>Baixo +</u> <u>Mod</u> <u>(Kabat)</u>
<u>heRX1-9.G4</u>	<u>pMXC15</u>	<u>Risco Baixo</u> <u>+ Mod (Linha</u> <u>germinal)</u>	<u>pMXC38</u>	<u>Risco</u> <u>Baixo</u> <u>(Kabat)</u>

Desenvolvimento de Células CHO-K1 transfectadas de Modo Permanente

Os vetores descritos acima (Tabela 4) contendo uma cópia de cada gene de cadeia pesada e leve são transfectados em células CHO-K1 adaptadas a Ex-Cell 302. As células CHO-K1 adaptadas ao crescimento em suspensão em meio Ex-Cell 302 são electroporadas tipicamente com 40 µg de vetor linearizado. De um modo alternativo, o DNA linearizado pode ser complexado com polietilenoamina (PEI) linear e utilizado para transfeção. As células são colocadas em cultura em placas de 96 poços contendo meio Ex-Cell 302 suplementado com FBS a 1% e G418. Os clones são rastreados em placas de 96 poços e ~10% dos melhores clones de cada transfeção são transferidos para placas de 24 poços contendo meio Ex-Cell 302.

Um teste de produtividade é realizado em placas de 24 poços em meio Ex-Cell 302 para culturas em crescimento durante 7 e 14 dias nos quais os sobrenadantes da cultura são testados quanto aos níveis de anticorpo secretado através de um ensaio ELISA para detecção de imunoglobulina IgG.

Os melhores clones são transferidos para frascos de agitação contendo meio Ex-Cell 302. Assim que as células se encontram adaptadas ao crescimento em suspensão, é realizado um teste de frasco de agitação para estes clones em meio Ex-Cell 302. As células são colocadas a crescer até 10 dias em frascos de *Erlenmeyer* de 125 ml contendo 25 ml de meio. Pelo menos a cada dia alternado do período de incubação os frascos são abertos para permitir trocas gasosas e os níveis de polipéptido imunoglobulina IgG no meio de cultura são determinados através de ELISA no final do período de incubação. As transfeções múltiplas

sequenciais da mesma linha celular com dois ou três vetores de transcrição de duas ou três multiunidades originam clones e linhas celulares que apresentam aumento adicional nos níveis de produção de imunoglobulina, de um modo preferido para 300 mg/ml ou mais.

Purificação

Pode ser desenvolvido um processo para a purificação de polipéptidos de imunoglobulina a partir de vetores e todas as linhas. De acordo com métodos bem conhecidos na técnica, as células são removidas por filtração após a finalização. O filtrado é aplicado numa coluna de Proteína A (em várias vezes, se necessário). A coluna é lavada e posteriormente os polipéptidos de imunoglobulina expressos e secretados são eluídos a partir da coluna. Para preparação do produto anticorpo, o *pool* de Proteína A é mantido a pH baixo (pH 3 durante um mínimo de 30 minutos e um máximo de uma hora) como um passo de inativação viral. Um passo de adsorção de troca iónica é posteriormente utilizado para uma purificação adicional do produto. O eluato resultante da coluna adsorção de separação é passado por um filtro de retenção viral para providenciar uma limpeza adicional de potenciais partículas virais. O filtrado é adicionalmente purificado por passagem através de uma coluna de troca aniónica à qual o produto não se liga. Finalmente, o processo de purificação é concluído por transferência do produto para a solução tampão de formulação através de diafiltração. O concentrado é ajustado a uma concentração proteica de pelo menos 1 mg/mL, e é adicionado um estabilizante.

Atividade de Ligação

É avaliada a atividade de ligação M-CSF dos anticorpos recombinantes Human Engineered™. A proteína é purificada a partir dos sobrenadantes de cultura do frasco de agitação por uma passagem através de uma coluna de Proteína A seguida da determinação de concentração pela A_{280} . Os ensaios de ligação são efetuados como descrito no Exemplo 1 acima ou 12 abaixo. Placas Immulon II são pré-revestidas com o antigénio sM-CSF pré-diluído numa solução de revestimento de PBS para imobilização do mesmo na microplaca. São adicionadas várias concentrações de teste de M-CSF variando entre 0,25 e 20 $\mu\text{g/ml}$ a 50 $\mu\text{l/poço}$ e incubação a 4 °C durante a noite. As placas são posteriormente lavadas 3 vezes com PBS-0,05% Tween. O bloqueio é realizado através de adição em PBS-0,05% Tween com BSA a 1% seguido de uma incubação de 30 minutos a 37 °C. São preparadas diluições de polipéptidos de imunoglobulinas em solução PBS-0.05% Tween com BSA a 1%. São preparadas diluições em série 1:2 ou 1:3 e adicionadas (100 $\mu\text{l/poço}$) em duplicado ou triplicado. Após uma incubação de 90 minutos a 37 °C, a microplaca é lavada 3 vezes com PBS-0,05% Tween. Para amplificação de sinal, é adicionado a cada poço anticorpo secundário de cabra anti-IgG (específico para gamma ou Fc) humana conjugado com peroxidase e incubado durante 60 minutos a 37 °C seguido de incubação de OPD a 0,4 mg/ml em tampão citrato com H_2O_2 a 0,012%. Após 5 - 10 minutos à temperatura ambiente o ensaio é terminado através da adição de 100 μl de H_2SO_4 a 1M e as placas são lidas a 490 nm. Foram utilizados ambos os anticorpos anti-IgG humano (específica de gamma) e anti-IgG humano (específica de Fc) de cabra.

EXEMPLO 5

O exemplo seguinte estabelece um procedimento para o tratamento de humanos utilizando anticorpo específico de M-CSF, tal como anticorpo derivado de RX1 ou competidor de RX1, incluindo um anticorpo RX1 Human Engineered™ com uma região constante IgG1 ou IgG4 modificada ou não modificada. O procedimento também pode ser seguido para um anticorpo derivado de MC1 ou MC3 ou competitivo para MC1 ou MC3. A dosagem eficaz esperada varia de 2 µg/kg a 10 mg/kg. Esta estimativa é baseada nos seguintes dados experimentais racionalmente sustentados:

O nível de M-CSF medido em plasma humano (tanto em indivíduos saudáveis como em doentes com cancro da mama) é cerca de 1 ng/ml. O anticorpo RX1 neutralizante de MCSF tem uma EC₅₀ mensurável de 2 ng/ml comparando com 1 ng/ml de M-CSF humano. De um modo concordante, a concentração eficaz de anticorpo em plasma humano tem um valor expectável de 10 a 50 000 vezes maior em relação ao seu EC₅₀, *i.e.* 20 ng/ml a 100 µg/ml de anticorpo em plasma humano. Tendo em conta estudos de farmacocinética, de modo a que esta concentração seja eficaz em doentes humanos, é necessária uma dosagem de 2 mg/kg a 10 mg/kg para atingir 20 ng/ml a 100 µg/ml de concentração de anticorpo em plasma.

EXEMPLO 6

Este exemplo estabelece um procedimento para a avaliação de atividade anticancerígena de anticorpo monoclonal anti-M-CSF num modelo subcutâneo. O exemplo 2 acima demonstra que o tratamento com anticorpo monoclonal anti-M-CSF inibiu de um modo significativo o crescimento tumoral em medula

óssea. O objetivo deste estudo é avaliar se o anticorpo pode também inibir o crescimento tumoral em tecidos moles.

Serão utilizados neste estudo ratinhos fêmea nu/nu com uma idade de 10 semanas, peso médio ~20g. Antes do estudo iniciar os ratinhos sofrem um período de aclimatação de pelo menos 7 dias. No dia 0, o lado direito de ratinhos *nude* será injetado de um modo subcutâneo com células de cancro do cólon humano a 5×10^6 células por ratinho por 100 μ l. Quando o volume tumoral atinge 100 - 200 mm^3 (normalmente 1 semana após inoculação tumoral), os ratinhos serão distribuídos ao acaso em grupos de 10 ratinhos por grupo como se segue:

- 1) PBS
- 2) RX1
- 3) 5A1
- 4) controlo de isotipo do anticorpo mIgG1+rIgG1
- 5) 5A1+RX1

Os ratinhos serão tratados de um modo intraperitoneal com os anticorpos designados a 10mpk uma vez por semana durante 4 semanas. Quando o volume tumoral atinge 2000 mm^3 , o estudo será terminado. De um modo alternativo, os animais serão eutanizados quando ocorrer uma das situações seguintes: ulceração de superfície tumoral maior do que 30% do que a área total de superfície tumoral, perda significativa de massa corporal (> 20%), desidratação, e morbidade. O sangue total será recolhido de todos os ratinhos e a população de monócitos será analisada como potencial marcador substituto. Será quantificado crescimento/tamanho tumoral através de análise 2-D. Serão utilizadas medições de largura e comprimento tumorais para calcular o volume tumoral. É esperado que o crescimento

tumoral em tecidos moles seja inibido como resultado da experiência acima.

EXEMPLO 7

O seguinte exemplo estabelece um procedimento para a avaliação de terapia de combinação para o tratamento e prevenção de doença osteolítica grave associada a metástases cancerígenas.

Conceção experimental. O estudo descrito no Exemplo 5 acima é repetido na sua essência como descrito com as seguintes exceções. Para além do anticorpo ou combinação de anticorpos estabelecidos nos grupos de tratamento abaixo, os animais irão receber um dos seguintes tratamentos adicionais:

1. Bisfosfonato (*e.g.*, Aredia; Zometa; Clodronato).
2. Cirurgia
3. Radiação
4. Quimioterapia
5. Terapia hormonal (*e.g.*, Tamoxifeno; terapia com anti-Androgénio)
6. Terapia com anticorpos (*e.g.*, anticorpos neutralizantes de RANKL/RANK; anticorpos neutralizantes de PTHrP)
7. Terapia com proteína terapêutica (*e.g.*, recetor solúvel de RANKL; OPG, e inibidores de PDGF e MMP)
8. Terapia com fármacos de pequenas moléculas (*e.g.*, inibidor de Src-cinase)
9. Terapia com oligonucleótidos (*e.g.*, Anti-sense RANKL ou RANK ou PTHrP)
10. Terapia genética (*e.g.*, inibidores de RANKL ou RANK)
11. Terapia com péptidos (*e.g.* muteínas de RANKL)

Os grupos de tratamento são como se segue. Os tratamentos adicionais acima estão indicados abaixo como "mais terapia X":

1. PBS apenas
2. tratamento com terapia X apenas
3. controlo de isotipo de IgG1 de rato
4. controlo de isotipo de IG1 de murino
5. RX1 anti-MCSF humano apenas
6. 5A1 anti IgG1-MCSF de ratinho produzido apenas em rato
7. combinação de controlo de isotipo de IgG1 de rato e de IgG1 de murino
8. combinação de RX1 e 5A1
9. controlo de isotipo de IgG1 de rato mais terapia X
10. controlo de isotipo de IgG1 de murino mais terapia X
11. RX1 anti-MCSF humano mais terapia X
12. 5A1 IgG1 anti-MCSF de ratinho produzido em rato com terapia X
13. combinação de controlo de isotipo de IgG1 de rato e de IgG1 de murino mais terapia X
14. combinação RX1 e 5A1 mais terapia X

Dosagem: cada anticorpo a 0,1 - 30 mg/kg é utilizado para administração em cada animal. A dosagem preferida é 10 mg/kg. A via de administração pode ser IV, IP, SC. A via preferida é IP. O tratamento começará no dia a seguir à injeção de células tumorais, como descrito no Exemplo 5, acima.

Medições. Para determinar a gravidade da osteólise entre os vários grupos de tratamento, a cada ratinho é atribuída uma imagem Faxitron de linha de base obtida no dia a seguir à injeção de células tumorais. É também obtida uma imagem Faxitron no final do estudo (8 semanas). O crescimento tumoral é medido de modo simultâneo utilizando o sistema

Xenogen uma vez que as células tumorais expressam luciferase de um modo estável. É esperado que a terapia de combinação para o tratamento e prevenção de doença osteolítica grave associada a metástases cancerígenas seja melhorada apenas com terapia de anticorpo.

EXEMPLO 8

O exemplo seguinte providencia um protocolo para avaliação de capacidade de ligação de anticorpo específico de M-CSF a, por exemplo, células de cancro da mama (linha celular MDA231) ou células cancerígenas de mieloma múltiplo (linha celular ARH77) utilizando um classificador celular ativado por fluorescência.

As células foram primeiro lavadas duas vezes com PBS (sem Ca^{2+} , Mg^{2+}). Por cada 10 cm de placa, foram adicionados 2 ml de EDTA a 3 mM, e as placas foram incubadas a 37 °C durante 2-3 minutos, até as células se tornarem arredondadas e iniciarem a separação do disco. De seguida, foram adicionados 10 ml de solução tampão A (PBS + FBS a 5%) e misturadas. Neste ponto, as células foram recolhidas em *pellet* e ressuspensas a cerca de 5×10^6 células/ml em PBS + FBS a 5%, e as células foram colocadas em túbulos a 100 μl /amostra.

Neste ponto, foram adicionados 0,1-10 $\mu\text{g/ml}$ do anticorpo primário (utilizado à concentração indicada de anticorpo M-CSF ou anticorpo controlo). Foi feita uma diluição, se necessário, em PBS com FBS a 5%. A mistura foi posteriormente incubada durante 30 min a 4 °C. Após o período de incubação, as células foram lavadas 3 vezes através de centrifugação a 400 g durante 5 min, e as células foram ressuspensas em PBS.

O anticorpo anti-IgG marcado com FITC ou PE (0,25 µg/amostra) foi diluído em BSA a 1% em PBS à diluição ótima, e as células foram ressuspensas nesta solução e incubadas durante 30 min a 4 °C. De seguida, as células foram lavadas 3 vezes tal como descrito acima. Após as lavagens de células, as células foram ressuspensas em 0,5 ml/amostra de PI-PBS (para distinguir as células mortas das vivas se necessário). As células podem também ser fixas para análise posterior (as células são estáveis durante cerca de 3 dias se estiverem fixas em formaldeído a 0,1%). As células foram posteriormente analisadas num classificador celular ativado por fluorescência utilizando procedimentos padrão.

Como apresentado nas Figuras 8A e 8B, um anticorpo RX1 específico de MCSF liga-se à linha celular de cancro da mama MDA231 ou à linha celular de cancro de mieloma múltiplo ARH77 a uma multiplicidade de concentrações de anticorpo como indicado.

EXEMPLO 9

O seguinte exemplo mostra que M-CSF é prevalente em várias superfícies celulares cancerígenas. Foi efetuada uma coloração de M-CSF por imunohistoquímica utilizando um anticorpo RX1 específico de M-CSF como se segue.

Inicialmente, as lamínas foram aquecidas num forno a 55 - 60 °C durante 1 hora e deixadas arrefecer durante 2-3 minutos. Foram utilizados os seguintes parâmetros de desparafinação e rehidratação:

- | | |
|---------------------------|------------------------|
| a. Xileno | 3 x 5 minutos |
| b. Reagente Álcool a 100% | 2 x 5 minutos |
| c. Reagente Álcool a 95% | 2 x 4 minutos |
| d. Reagente Álcool a 75% | 2 x 3 minutos |
| e. Reagente Álcool a 50% | 1 x 3 minutos |
| g. dH ₂ O | 2 - 3 lavagens rápidas |

Antes do passo de bloqueio com peróxido, foi preparada a recuperação de antigénio utilizando Biogenex Citra Plus 1 x. A solução foi levada ao micro-ondas à potência máxima até à ebulição. Uma vez em ebulição, o micro-ondas foi rapidamente ajustado para mais 13 min ao nível de potência 2, e deixado arrefecer antes de continuar. O passo de bloqueio com peróxido foi realizado como se segue. As lâminas foram imersas em H₂O₂ a 3% (25ml a 30% para 250ml de dH₂O) e colocadas à temperatura ambiente durante 10 minutos. As lâminas foram posteriormente lavadas 2x com dH₂O, e lavadas 2 x 2 minutos com PBS 1X.

O procedimento de bloqueio avidina/biotina foi realizado como se segue. As lâminas foram colocadas na posição horizontal num suporte metálico. Foi utilizada uma caneta Blue PAP (marcador hidrofóbico de lâminas) à volta do tecido. De seguida, foram adicionadas 2 gotas de Zymed Avidin (Reagente A) - o suficiente para cobrir o tecido - e as lâminas foram incubadas à temperatura ambiente durante 10 minutos. Após a incubação, as lâminas foram lavadas como se segue:

2 x lavagens de 3 minutos em PBS 1X.

2 gotas de Biotina Zymed (Reagente B), temperatura ambiente durante 10 min.

2 x lavagens de 3 minutos em PBS 1X.

O procedimento de bloqueio da proteína foi realizado como se segue. Primeiro, foi adicionado soro a 10% [a uma concentração final de 2%] de espécie de anticorpo secundário. O BioGenex Power Block foi diluído de seguida até 1X com dH₂O. O suporte de lâminas foi imerso em Power Block durante 8 min à temperatura ambiente, e as lâminas foram lavadas 2x em PBS 1X.

Para a adição do anticorpo primário (RX1), as lâminas foram colocadas na posição horizontal no suporte metálico. O anticorpo foi adicionado para cobrir cada secção (~350µl), e o anticorpo foi espalhado com a ponta de uma pipeta (se necessário) sem danificar o tecido. As lâminas foram posteriormente incubadas durante 1 hora à temperatura ambiente. Após a incubação, as lâminas foram lavadas 3 x com PBS 1X 3-5 minutos cada lavagem. Neste ponto, foi aplicado BioGenex Multi-Link às secções e estas incubadas durante 10-11 minutos à temperatura ambiente. As secções foram posteriormente lavadas durante 3 minutos de cada vez.

A marcação foi realizada através da aplicação de BioGenex HRP Label a secções, as quais foram posteriormente incubadas à temperatura ambiente durante 10-11 min e lavadas com PBS 1X 3 x 3 minutos. De seguida, foi adicionado substrato BioGenex H₂O₂ (1 gota AEC por cada 2,5 ml de H₂O₂) às secções e incubado à temperatura ambiente durante 10 min. As secções foram posteriormente lavadas várias vezes com dH₂O. O passo de contracoloração foi realizado como se segue. As secções foram coradas com hematoxilina durante 1 minuto à temperatura ambiente. De seguida, as secções foram lavadas com H₂O duas vezes, e posteriormente incubadas em PBS 1 X durante 1 minuto. As secções foram posteriormente lavadas com H₂O para remover o PBS. As secções foram montadas através da aplicação de uma

gota de BioGenex Super Mount à secção e depois deixadas secar ao ar durante a noite à temperatura ambiente.

Como apresentado na Figura 9, o M-CSF é prevalente em várias superfícies de células cancerígenas. As seções para os tipos de células cancerígenas indicadas foram classificadas como se segue:

- 0 Sem coloração
- 1 Coloração semelhante ao fundo
- 2 Positiva, mas coloração fraca
- 3 Positiva e coloração significativa
- 4 Positiva e coloração forte

EXEMPLO 10

O exemplo que se segue apresenta o procedimento para produzir anticorpos MC1 e MC3. Os MC1 e MC3 são dois anticorpos de murino monoclonais que neutralizam o anticorpo M-CSF humano e se ligam ao humano. As sequências de aminoácido destes anticorpos são apresentadas nas Figuras 14 e 15, respetivamente. Elas foram identificadas através de uma série de passos que incluem a) imunização de ratinhos Balb C com M-CSF recombinante humano; b) rastreio de clones positivos que produzam anticorpos que se liguem a M-CSF humano num formato ELISA; c) subclonagem de clones positivos para originar clones de hibridoma estáveis; d) aumento da escala de cultura celular para produzir grandes quantidades de anticorpos; e) purificação e caracterização de anticorpos em análise de afinidade, ligação celular e ensaio de atividade de neutralização tal como descrito nos exemplos anteriores.

As Figuras 16A e 16B apresentam o alinhamento das CDRs das cadeias pesada e leve, respectivamente, dos anticorpos RX1, 5H4, MC1 e MC3.

As versões humanizada e human engineered™ são geradas tal como descrito nos exemplos acima.

EXEMPLO 11

Este exemplo mostra que os anticorpos M-CSF RX1 e 5H4, assim como os seus fragmentos Fab, têm atividades de neutralização diferentes. O exemplo que se segue também mostra que os anticorpos RX1, 5H4, e MC3 têm afinidades diferentes para M-CSF. De um modo adicional, este exemplo demonstra que as afinidades dos anticorpos acima mencionados intactos são maiores relativamente aos fragmentos Fab dos anticorpos acima mencionados.

As atividades de neutralização dos fragmentos intactos RX1 e 5H4 *versus* os fragmentos Fab de RX1 e 5H4 foram determinados através da medição da proliferação celular dependente de M-CSF na presença de várias concentrações de anticorpo. A proliferação celular foi determinada com um corante quimioluminescente. Tal como mostrado na Figura 17, o RX1 intacto tem a potência mais alta, enquanto que o fragmento Fab de RX1 perdeu a sua potência e se comporta como os fragmentos 5H4 e Fab 5H4.

As propriedades de ligação dos anticorpos acima mencionados foram analisadas utilizando análises Biacore. De forma a determinar as afinidades relativas de RX1, 5H4, e MC3 a M-CSF, foi imobilizado o Fc de coelho anti-ratinho num chip de biossensor CM5 através de ligação com amina. Os anticorpos acima mencionados foram então capturados no chip de biossensor Fc/CM5 anti-ratinho a 1,5mg/ml durante 3 min

a 2ml/min. O MCSF foi colocado a fluir sobre a superfície do biossensor modificado a várias concentrações ($R_{max} \sim 15$). Os anticorpos e antigénios teste foram diluídos em HEPES a 0,01 M, pH 7,4, NaCL a 0,15 M, EDTA a 3 mM, Surfactante P20 (HBS-EP) 0,005%. Todas as experiências foram levadas a cabo a 25 °C. As constantes cinética e de afinidade foram determinadas utilizando um *software* Biaevaluation (Biacore) com um ajuste modelo/global de interação 1:1. Tal como abaixo apresentado na Tabela 8, o RX1 liga-se a M-CSF com a maior afinidade em relação a 5H4 e MC3.

Tabela 8

	K_a ($M^{-1} Sec^{-1}$)	K_d (sec^{-1})	KD (nM)
RX1	$1,64e^6$	$2,7e^{-4}$	0,16
5H4	$5,94e^5$	$1,77e^{-3}$	3,0
MC3	$7,04e^5$	$1,93e^{-4}$	0,27

Para determinar as diferenças relativas na afinidade de ligação dos fragmentos intactos de Mab e Fab de RX1, 5H4, e MC3, foi utilizada uma configuração alternativa na análise Biacore. De um modo específico, foi imobilizado um M-CSF num chip de biossensor CM5 através de uma ligação com amina. Foi injetado M-CSF a 0,05 mg/ml em acetato de sódio a 10 mM pH 4,0 a 1 ml/min durante 5 minutos para alcançar $RL=6-12$ RU. Os anticorpos teste (ou fragmento Fab) foram colocados a fluir sobre a superfície do biossensor modificada a várias concentrações. Os anticorpos teste foram diluídos em HEPES a 0,01 M pH 7,4, NaCL a 0,15 M, EDTA a 3 mM, Surfactante P20 (HBS-EP) a 0,005% e todas as experiências foram levadas a cabo a 25 °C. As constantes cinética e de afinidade foram determinadas utilizando um *software* Biaevaluation (Biacore) com um ajuste modelo/global de interação 1:1. Tal como abaixo apresentado

na Tabela 9, o RX1 liga-se a M-CSF com a maior afinidade em relação a outros anticorpos testados. O fragmento Fab de RX1 liga-se a M-SCF com uma afinidade significativamente menor que à holoproteína RX1.

Tabela 9

	Ka ($M^{-1} Sec^{-1}$)	Kd (sec^{-1})	KD (nM)
rRX1 (ratinho)	2,34e⁵	2,35e⁻⁴	1,0
rRX1 Fab (ratinho)	2,81e⁵	3,03e⁻³	10,8
5H4	1,27e⁵	1,26e⁻³	9,9
5H4 Fab	2,04e⁵	2,85e⁻³	14,0

Os dados de afinidade de ligação e neutralização indicam que a atividade de neutralização de RX1 se deve primariamente à sua afinidade marcadamente alta para M-CSF, e que esta alta afinidade pode dever-se pelo menos em parte à capacidade de ambos os braços do anticorpo se ligarem de um modo simultâneo ao dímero de M-CSF.

EXEMPLO 12

O exemplo seguinte revela o epítipo linear (i.e., sequência de aminoácidos) em M-CSF reconhecido por anticorpos RX1, 5H4, e MC3.

Inicialmente, a estratégia de mapeamento do epítipo foi desenhada para determinar se os anticorpos RX1, 5H4, e MC3 reconheciam epítipos lineares ou epítipos conformacionais dentro de M-CSF. De um modo concordante, os anticorpos anti-M-CSF foram testados contra 0,1 mg M-CSF sob condições redutoras e não redutoras. Apenas a forma não reduzida de

M-CSF foi reconhecida por cada um dos epítomos, sugerindo que os epítomos reconhecidos são descontínuos na natureza.

De seguida, o epítopo linear de M-CSF foi determinado para cada anticorpo. De um modo específico, foram preparadas as membranas SPOTs (Sigma Genosys) onde os fragmentos da sequência de interesse de M-CSF, abrangendo péptidos 10-mer sintetizados com um *offset* de aminoácidos, foram carregados no suporte membranar de celulose. Estas membranas foram então marcadas com os anticorpos acima mencionados e foram identificados os SPOTs reativos. A sequência peptídica foi então identificada através da sua localização correspondente na membrana, e foram identificados como o epítopo os aminoácidos de sobreposição dentro dos péptidos que reagiram de modo positivo. Tal como apresentado na Figura 18, o RX1 liga-se a um epítopo linear diferente de 5H4 e MC3, o que mapeia para uma localização diferente em M-CSF. O RX1 liga-se a um epítopo linear representado por RFRDNTPN (SEQ ID No.: 120) ou RFRDNTAN (SEQ ID No.: 121), aminoácidos 98-105 de M-CSF da Figura 12. O 5H4 liga-se a um epítopo linear representado por ITFEFVDQE (SEQ ID No.: 122), aminoácidos 65-73 de M-CSF da Figura 12. O MC3 liga-se a dois epítomos lineares representados por (1) ITFEFVDQE (SEQ ID No.: 122), aminoácidos 65-73 de M-CSF de Figura 12 e (2) FYETPLQ (SEQ ID No.: 123), aminoácidos 138-144 de M-CSF de Figura 12.

EXEMPLO 13

Foi determinada a afinidade de ligação das versões Human Engineered™ dos anticorpos RX1 preparados tal como descrito acima no Exemplo 4A. Este exemplo mostra que os anticorpos Human Engineered™ com diferentes regiões constantes de subclasse de IgG se ligam a M-CSF com diferentes afinidades *in vitro*. Para determinar as diferenças relativas na

afinidade de ligação de anticorpos intactos através de uma análise Biacore, o M-CSF foi imobilizado num chip de biossensor CM5 através de uma ligação amina. Foi injetado M-CSF a 0,05 mg/ml em Acetato de Sódio a 10mM pH 4,0 a 1 ml/min durante 5 minutos para alcançar RL=6-12 RU. O anticorpo teste ou os fragmentos Fab foram colocados a fluir ao longo da superfície modificada do biossensor a várias concentrações que variavam desde 100 nM a 1,5 nM em diluições de 2 vezes. Os anticorpos teste foram diluídos em HEPES 0,01 M pH 7,4, NaCL 0,15 M, EDTA a 3 mM, Surfactante P20 (HBS-EP) a 0,005% e todas as experiências foram levadas a cabo a 25 °C. Cada ponto de concentração e ensaios a branco foram corridos em triplicado, e os dados foram recolhidos ao longo de 3 minutos de associação e 8 minutos de dissociação. As constantes cinética e de afinidade foram determinadas utilizando um software Biaevaluation (Biacore) com um ajuste modelo/global de interação 1:1. Tal como apresentado na Tabela 10 abaixo, o heRX1-1.G1 e heRX1-1.G4 ligam-se a M-CSF com afinidades que de forma mais próxima se assemelham à afinidade de ligação de RX1-M-CSF de murino.

Tabela 10.

Anticorpo	Ka (M⁻¹ Sec⁻¹)	Kd (sec⁻¹)	KD (nM)
Murino RX1 n = 21	(2,23 ± 0,35) x 10 ⁵	(1,56 ± 0,67) x 10 ⁻⁴	0,7 ± 0,27
heRX1-1.G2 n = 5	(2,36 ± 0,18) x 10 ⁵	(1,37 ± 0,24) x 10 ⁻³	5,9 ± 1,4
heRX1-10.G2 n = 2	(1,73 ± 0,29) x 10 ⁵	(1,1 ± 0,11) x 10 ⁻³	6,3 ± 1,7
heRX1-1.G1	2,50 x 10 ⁵	2,38 x 10 ⁻⁴	0,95
heRX1-1.G4	2,07 x 10 ⁵	2,93 x 10 ⁻⁴	1,42

Em contraste, tal como apresentado na Tabela 11 abaixo, apesar de ter havido alguma variação na afinidade de ligação, todos os construtos Gamma-2 apresentaram pelo menos um decréscimo de 7 vezes na afinidade de ligação quando comparados com o anticorpo parente de murino.

Tabela 11.

Anticorpo	Ka ($M^{-1} Sec^{-1}$)	Kd (sec^{-1})	KD (nM)
Murino RX1 n = 21	(2,23 ± 0,35) $\times 10^5$	(1,56 ± 0,67) $\times 10^{-4}$	0,7 ± 0,27
heRX1-1.G2 n = 5	(2,36 ± 0,18) $\times 10^5$	(1,37 ± 0,24) $\times 10^{-3}$	5,9 ± 1,4
heRX1-2.G2	2,18 $\times 10^5$	1,65 $\times 10^{-3}$	7,6
heRX1-3.G2	2,01 $\times 10^5$	1,18 $\times 10^{-3}$	5,9
heRX1-4.G2	2,38 $\times 10^5$	1,08 $\times 10^{-3}$	4,6
heRX1-5.G2	1,75 $\times 10^5$	1,29 $\times 10^{-3}$	7,4
heRX1-6.G2	1,88 $\times 10^5$	1,49 $\times 10^{-3}$	7,9
heRX1-7.G2	1,57 $\times 10^5$	1,49 $\times 10^{-3}$	9,5
heRX1-8.G2	1,52 $\times 10^5$	1,48 $\times 10^{-3}$	9,8
heRX1-8.G2	2 $\times 10^5$	1,44 $\times 10^{-3}$	7,2
heRX1-10.G2	(1,73 ± 0,29) $\times 10^5$	(1,1 ± 0,11) $\times 10^{-3}$	6,3 ± 1,7

EXEMPLO 14

Este exemplo mostra que os anticorpos RX1 Human Engineered™ com diferentes regiões constantes de subclasse de IgG se ligam a M-CSF com diferentes afinidades *in vitro*. Para testar a atividade de neutralização dos anticorpos M-CSF, foi utilizado um ensaio de proliferação da linha celular M-NFS-60 (American Type Culture Collection, No. de Acesso CRL-1838, disponível a partir de ATCC em Rockville, MD, EUA, derivada de uma leucemia mielógena induzida com o

retrovírus ecotrópico de ratinho selvagem Cas-Br.MuLV. A linha celular responde a ambas as interleucinas 3 e M-CSF e contém um proto-oncogene c-myb truncado causado pela integração de um retrovírus). A proliferação de M-NFS-60 requer M-CSF ativo numa forma dependente da dosagem. No ensaio, as células M-NFS-60 foram lavadas e plaqueadas em meio RPIM 1640 com FBS a 10% e Pen/Strep a 1%. O M-CSF recombinante humano (a uma concentração final de 10 ng/ml, a qual é equivalente a 3000 U/ml de atividade de M-CSF), foi incubado com várias concentrações de anticorpo variando desde 1 µg/ml até 0,5 ng/ml (em diluições em série de 2 vezes) durante 1 hora a 37°C em CO₂ a 5% num incubador. A seguir ao incubador, foi adicionada a mistura à cultura de M-NFS-60 em placas de microtitulação de 96 poços. O volume total do ensaio por poço foi de 100 µl, com M-CSF a 10 ng/ml, e a concentração de anticorpo indicada. As células foram incubadas a 37 °C sob CO₂ a 5% durante 72 horas antes de os números de células serem quantificados através de um ensaio CellTiter Glo (Promega). Cada anticorpo foi testado em triplicado, com uma repetição no dia seguinte (para um total de seis ensaios por anticorpo). O IC₅₀ de cada anticorpo foi analisado através de uma curva de ajuste.

O ensaio foi repetido utilizando MCSF humano em soro, meio condicionado MDA231 (que contém M-CSF), MCSF de macaco cinomólogo em soro, e MCSF recombinante de macaco cinomólogo. Os resultados são apresentados nas Figuras 25 (MCSF recombinante), 26 (MCSF humano em soro) e 27 (meio condicionado MDA231) como a leitura fluorescente do ensaio de CellTiter Glo, que é linear com o número de células. A atividade de neutralização dos anticorpos é apresentada como uma inibição da proliferação das células M-NFS-60.

Os resultados mostram que o IC₅₀ de heRX1-1-IgG e heRX1-1-IgG4 foram aproximadamente os mesmos dos anticorpos RX1

recombinantes dos parentes murino, enquanto que o IC₅₀ de heRX1-1-IgG2 foi cerca de 2 vezes a 4 vezes superior.

A Tabela 12 abaixo apresenta o IC₅₀ relativo (em termos de perda de IC₅₀) dos vários construtos de IgG2 preparados tal como descrito acima no Exemplo 4A. Destes construtos, os heRX1-1.G2 e heRX1-10.G2 apresentaram a menor redução no IC₅₀.

Tabela 12

Anticorpo	Perda de IC50
heRX1-1.G2	2,8 x
heRX1-2.G2	3,1 x
heRX1-3.G2	5,3 x
heRX1-4.G2	4,6 x
heRX1-5.G2	6,5 x
heRX1-6.G2	5,9 x
heRX1-7.G2	6,1 x
heRX1-8.G2	5,9 x
heRX1-9.G2	3,6 x
heRX1-10.G2	2,2 x
heRX1-1.G1	Sem perda
heRX1-1.G4	Sem perda
heRX1-10.G1	Sem perda
heRX1-10.G4	Sem perda

EXEMPLO 15

Este exemplo mostra que os anticorpos RX1 Human Engineered™ com diferentes regiões constantes de subclasses de IgG possuem diferentes atividades TRAP num ensaio de osteoclastogénese *in vitro*.

As células CD34+ de medula óssea humana (catálogo Biowhittaker, número 2M-101A, 3 x 10⁵ células/frasco) foram induzidas a diferenciar-se em osteoclastos sob as condições experimentais aqui descritas. No Dia 1, as células CD34+ foram descongeladas a partir de um frasco congelado para 10 ml de meio (Alpha MEM com FCS a 10%, 1 x Pen Strep e 1x fungizona). As células foram lavadas uma vez e ressuspensas em 2 ml de meio e colocadas numa placa de 96 poços a 100 µl por poço. No Dia 2, sem remover o meio original, foram adicionados a cada poço 50 µl de CSF-1 4x a 30 ng/ml de concentração final e 50 µl de RANKL 4x (sRANKL, Chemicon catálogo # GF091, 10 µg/pacote) a uma concentração final de 100 ng/ml. No Dia 7, foram adicionados a cada poço 50 µl de RANKL 5x a uma concentração final de 100 ng/ml. No Dia 17, as células foram marcadas quanto à atividade TRAP (*kit Leukocyte Acid Phosphatase* para marcação TRAP, catálogo Sigma # 387-A) e examinados ao microscópio.

Os anticorpos neutralizantes de M-CSF são adicionados no dia 2 do ensaio. Os anticorpos inibem a diferenciação em osteoclastos de uma forma dependente da dose tal como apresentado na Figura 28. A atividade inibitória dos anticorpos no ensaio de diferenciação em osteoclastos é apresentada como a falta de osteoclastos visíveis no Dia 17 do ensaio.

EXEMPLO 16

Os anticorpos RX1 Human Engineered™ com diferentes regiões constantes de subclasses de IgG foram adicionalmente classificados.

Os complexos antigénio-anticorpo que os vários anticorpos RX1 Human Engineered™ formaram com MCSF foram estudados através da combinação de M-CSF e anticorpo numa solução

tampão em razões molares iguais, seguido da análise do tamanho do complexo antigénio-anticorpo utilizando cromatografia de exclusão por tamanho ou por luz difusa. Os resultados mostraram que o parente murino de RX1 aparentava formar complexos 1:1 com MCSF de cerca de 200 kDa. Os anticorpos heRX1-9.G2 ou 1-10.G2 aparentavam formar complexos 2:1 ou 2:2 com MCSF de cerca de 400 kDa. O heRX1-1.G2 pareceu formar grandes agregados de rede com MCSF de mais de 2×10^6 Da. Os construtos IgG1 e IgG4 formaram pequenos complexos semelhantes aos do parente murino RX1.

O SDS-PAGE desnaturante redutor e não redutor de heRX1-1.G4 mostrou que a versão de IgG4 aparentava formar anticorpos pela metade, tal como esperado.

A partir do exposto, será apreciado que, apesar de terem aqui sido descritas formas de realização específicas da invenção, para propósitos de ilustração, possam ser feitas várias modificações sem desviar do âmbito da invenção.

LISTAGEM DE SEQUÊNCIAS

<110> LIU et al.
 <120> ANTICORPO MONOCLONAL ESPECÍFICO PARA M-CSF E
 RESPETIVOS USOS
 <130> 21601.003
 <140> A ser atribuído

<141> 2005-01-06
 <150> US 60/535181
 <151> 2004-01-07
 <150> US 60/576417
 <151> 2004-06-02
 <160> 137
 <170> Patent In versão 3.3
 <210> 1
 <211> 1401
 <212> DNA
 <213> Mus musculus
 <400> 1

```

atgggttggg cctgtatcat cctattcctg gtggccactg ccacaggtgt gcactccgac      60
gtgcagcttc aggagtcagg acctggcctc gtgaaacctt ctcagagtct gtcctcacc      120
tgtactgtca ctgactactc catcaccagt gattacgctt ggaactggat acggcaattc      180
ccaggaata aacttgagtg gatgggggtac ataagctaca gtggtagcac ttctacaat      240
ccatctctca aaagtcggat ctccatcact cgagacacat ccaagaacca gttcttctg      300
cagctgaact ctgtgactac tgaggacaca gccacatatt actgtgcatc cttcgactat      360
gccacgcca tggattactg gggccaaggg acttcgggtca ctgtctcttc cgccaaaaca      420
acagcccat cggcttatcc actggcccct gtgtgtggag atacaactgg ctctcgggtg      480
actctaggat gcctgggtcaa gggttatttc cctgagccag tgacctgac ctggaactct      540
ggatccctgt ccagtggtgt gcacaccttc ccagctgtcc tgcagtctga cctctacacc      600
ctcagcagct cagtgactgt aacctcgagc acctggccca gccagtccat cacctgcaat      660
gtggcccacc cggcaagcag caccaagggtg gacaagaaaa ttgagcccag agggcccaca      720
atcaagccct gtctccatg caaatgcca gcacctaac tcttgggtgg accatccgtc      780
ttcatcttcc ctccaaagat caaggatgta ctcatgatct ccctgagccc catagtcaca      840
tgtgtgggtg tggatgtgag cgaggatgac ccagatgtcc agatcagctg gtttgtgaac      900
aacgtggaag tacacacagc tcagacacaa acccatagag aggattacaa cagtactctc      960
cgggtgggtc gtgccctccc catccagcac caggactgga tgagtggcaa ggagttcaaa     1020
tgcaagggtc acaacaaga cctcccagcg cccatcgaga gaaccatctc aaaacccaaa     1080

```

```
gggtcagtaa gagctccaca ggtatatgtc ttgcctccac cagaagaaga gatgactaag 1140
aacagggtca ctctgacctg catggtcaca gacttcatgc ctgaagacat ttacgtggag 1200
tggaccaaca acgggaaaac agagctaaac tacaagaaca ctgaaccagt cctggactct 1260
gatggttctt acttcatgta cagcaagctg agagtggaaa agaagaactg ggtggaaaga 1320
aatagctact cctgttcagt ggtccaacgag ggtctgcaca atcaccacac gactaagagc 1380
ttctcccgga ctccgggtaa a 1401
<210> 2
<211> 447
<212> PRT
<213> Mus musculus
<400> 2
```

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

Ser Asp Leu Tyr Thr Leu Ser Ser Ser Val Thr Val Thr Ser Ser Thr
 180 185 190

Trp Pro Ser Gln Ser Ile Thr Cys Asn Val Ala His Pro Ala Ser Ser
 195 200 205

Thr Lys Val Asp Lys Lys Ile Glu Pro Arg Gly Pro Thr Ile Lys Pro
 210 215 220

Cys Pro Pro Cys Lys Cys Pro Ala Pro Asn Leu Leu Gly Gly Pro Ser
 225 230 235 240

Val Phe Ile Phe Pro Pro Lys Ile Lys Asp Val Leu Met Ile Ser Leu
 245 250 255

Ser Pro Ile Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Glu Asp Asp Pro
 260 265 270

Asp Val Gln Ile Ser Trp Phe Val Asn Asn Val Glu Val His Thr Ala
 275 280 285

Gln Thr Gln Thr His Arg Glu Asp Tyr Asn Ser Thr Leu Arg Val Val
 290 295 300

Ser Ala Leu Pro Ile Gln His Gln Asp Trp Met Ser Gly Lys Glu Phe
 305 310 315 320

Lys Cys Lys Val Asn Asn Lys Asp Leu Pro Ala Pro Ile Glu Arg Thr
 325 330 335

Ile Ser Lys Pro Lys Gly Ser Val Arg Ala Pro Gln Val Tyr Val Leu
 340 345 350

Pro Pro Pro Glu Glu Glu Met Thr Lys Lys Gln Val Thr Leu Thr Cys
 355 360 365

Met Val Thr Asp Phe Met Pro Glu Asp Ile Tyr Val Glu Trp Thr Asn
 370 375 380

Asn Gly Lys Thr Glu Leu Asn Tyr Lys Asn Thr Glu Pro Val Leu Asp
 385 390 395 400

Ser Asp Gly Ser Tyr Phe Met Tyr Ser Lys Leu Arg Val Glu Lys Lys
 405 410 415

Asn Trp Val Glu Arg Asn Ser Tyr Ser Cys Ser Val Val His Glu Gly
 420 425 430

Leu His Asn His His Thr Thr Lys Ser Phe Ser Arg Thr Pro Gly
 435 440 445

<210> 3

<211> 702

<212> DNA

<213> Mus musculus

<400> 3

atggtatcca cacctcagtt ccttgtattt ttgcttttct ggattccagc ctccagaggt 60
 gacatcttgc tgactcagtc tccagccatc ctgtctgtga gtccaggaga aagagtcagt 120
 ttctcctgca gggccagtca gagcattggc acaagcatac actggtatca gcaaagaaca 180
 aatggttctc caaggcttct cataaagtat gcttctgagt ctatctctgg gatcccttcc 240
 aggttttagtg gcagtggtac agggacagat ttactctta gcatcaacag tgtggagtct 300
 gaagatattg cagattatta ctgtcaacaa attaatagct ggccaaccac gttcggcggg 360
 gggacaaagt tggaaataaa acgggctgat gctgcaccaa ctgtatccat cttcccacca 420
 tccagtgagc agttaacatc tggaggtgcc tcagtcgtgt gcttcttgaa caacttctac 480
 cccaagaca tcaatgtcaa gtggaagatt gatggcagtg aacgacaaaa tggcgtcctg 540
 aacagttgga ctgatcagga cagcaaagac agcacctaca gcatgagcag caccctcacg 600
 ttgaccaagg acgagtatga acgacataac agctatacct gtgaggccac tcacaagaca 660
 tcaacttcac ccattgtcaa gagcttcaac aggaatgagt gt 702

<210> 4

<211> 214

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 4

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

Glu Arg Val Ser Phe Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Gly Thr Ser
 20 25 30

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

Lys Tyr Ala Ser Glu Ser Ile Ser Gly Ile Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60

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

Glu Asp Ile Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Gln Ile Asn Ser Trp Pro Thr

				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					
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			
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
210

<210> 5

<211> 109

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 5

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

Glu Arg Val Ser Phe Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Gly Thr Ser
 20 25 30

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

Lys Tyr Ala Ser Glu Ser Ile Ser Gly Ile Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60

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

Glu Asp Ile Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Gln Ile Asn Ser Trp Pro Thr
 85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Ala
 100 105

<210> 6

<211> 118

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 6

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

Ser Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Thr Asp Tyr Ser Ile Thr Ser Asp
 20 25 30

Tyr Ala Trp Asn Trp Ile Arg Gln Phe Pro Gly Asn Lys Leu Glu Trp
 35 40 45

Met Gly Tyr Ile Ser Tyr Ser Gly Ser Thr Ser Tyr Asn Pro Ser Leu
 50 55 60

Lys Ser Arg Ile Ser Ile Thr Arg Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Phe
 65 70 75 80

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

Ala Ser Phe Asp Tyr Ala His Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
 100 105 110

Ser Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 7

<211> 256

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 7

Met Thr Ala Pro Gly Ala Ala Gly Arg Cys Pro Pro Thr Thr Trp Leu
 1 5 10 15

Gly Ser Leu Leu Leu Val Cys Leu Leu Ala Ser Arg Ser Ile Thr
 20 25 30

Glu Glu Val Ser Glu Tyr Cys Ser His Met Ile Gly Ser Gly His Leu
 35 40 45

Gln Ser Leu Gln Arg Leu Ile Asp Ser Gln Met Glu Thr Ser Cys Gln
50 55 60

Ile Thr Phe Glu Phe Val Asp Gln Glu Gln Leu Lys Asp Pro Val Cys
65 70 75 80

Tyr Leu Lys Lys Ala Phe Leu Leu Val Gln Asp Ile Met Glu Asp Thr
85 90 95

Met Arg Phe Arg Asp Asn Thr Pro Asn Ala Ile Ala Ile Val Gln Leu
100 105 110

Gln Glu Leu Ser Leu Arg Leu Lys Ser Cys Phe Thr Lys Asp Tyr Glu
115 120 125

Glu His Asp Lys Ala Cys Val Arg Thr Phe Tyr Glu Thr Pro Leu Gln
130 135 140

Leu Leu Glu Lys Val Lys Asn Val Phe Asn Glu Thr Lys Asn Leu Leu
145 150 155 160

Asp Lys Asp Trp Asn Ile Phe Ser Lys Asn Cys Asn Asn Ser Phe Ala
165 170 175

Glu Cys Ser Ser Gln Gly His Glu Arg Gln Ser Glu Gly Ser Ser Ser
180 185 190

Pro Gln Leu Gln Glu Ser Val Phe His Leu Leu Val Pro Ser Val Ile
195 200 205

Leu Val Leu Leu Ala Val Gly Gly Leu Leu Phe Tyr Arg Trp Arg Arg
210 215 220

Arg Ser His Gln Glu Pro Gln Arg Ala Asp Ser Pro Leu Glu Gln Pro
225 230 235 240

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

<210> 8

<211> 554

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 8

Met Thr Ala Pro Gly Ala Ala Gly Arg Cys Pro Pro Thr Thr Trp Leu
 1 5 10 15
 Gly Ser Leu Leu Leu Val Cys Leu Leu Ala Ser Arg Ser Ile Thr
 20 25 30

Glu Glu Val Ser Glu Tyr Cys Ser His Met Ile Gly Ser Gly His Leu
 35 40 45

Gln Ser Leu Gln Arg Leu Ile Asp Ser Gln Met Glu Thr Ser Cys Gln
 50 55 60

Ile Thr Phe Glu Phe Val Asp Gln Glu Gln Leu Lys Asp Pro Val Cys
 65 70 75 80

Tyr Leu Lys Lys Ala Phe Leu Leu Val Gln Asp Ile Met Glu Asp Thr
 85 90 95

Met Arg Phe Arg Asp Asn Thr Pro Asn Ala Ile Ala Ile Val Gln Leu
 100 105 110

Gln Glu Leu Ser Leu Arg Leu Lys Ser Cys Phe Thr Lys Asp Tyr Glu
 115 120 125

Glu His Asp Lys Ala Cys Val Arg Thr Phe Tyr Glu Thr Pro Leu Gln
 130 135 140

Leu Leu Glu Lys Val Lys Asn Val Phe Asn Glu Thr Lys Asn Leu Leu
 145 150 155 160

Asp Lys Asp Trp Asn Ile Phe Ser Lys Asn Cys Asn Asn Ser Phe Ala
 165 170 175

Glu Cys Ser Ser Gln Asp Val Val Thr Lys Pro Asp Cys Asn Cys Leu
 180 185 190

Tyr Pro Lys Ala Ile Pro Ser Ser Asp Pro Ala Ser Val Ser Pro His
 195 200 205

Gln Pro Leu Ala Pro Ser Met Ala Pro Val Ala Gly Leu Thr Trp Glu
 210 215 220

Asp Ser Glu Gly Thr Glu Gly Ser Ser Leu Leu Pro Gly Glu Gln Pro
 225 230 235 240

Leu His Thr Val Asp Pro Gly Ser Ala Lys Gln Arg Pro Pro Arg Ser
 245 250 255

Thr Cys Gln Ser Phe Glu Pro Pro Glu Thr Pro Val Val Lys Asp Ser
 260 265 270

Thr Ile Gly Gly Ser Pro Gln Pro Arg Pro Ser Val Gly Ala Phe Asn
 275 280 285

Pro Gly Met Glu Asp Ile Leu Asp Ser Ala Met Gly Thr Asn Trp Val
 290 295 300

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

Thr Glu Leu Ser Pro Ser Arg Pro Gly Gly Gly Ser Met Gln Thr Glu
 325 330 335

Pro Ala Arg Pro Ser Asn Phe Leu Ser Ala Ser Ser Pro Leu Pro Ala
 340 345 350

Ser Ala Lys Gly Gln Gln Pro Ala Asp Val Thr Gly Thr Ala Leu Pro
 355 360 365

Arg Val Gly Pro Val Arg Pro Thr Gly Gln Asp Trp Asn His Thr Pro
 370 375 380

Gln Lys Thr Asp His Pro Ser Ala Leu Leu Arg Asp Pro Pro Glu Pro
 385 390 395 400

Gly Ser Pro Arg Ile Ser Ser Leu Arg Pro Gln Gly Leu Ser Asn Pro
 405 410 415

Ser Thr Leu Ser Ala Gln Pro Gln Leu Ser Arg Ser His Ser Ser Gly
 420 425 430

Ser Val Leu Pro Leu Gly Glu Leu Glu Gly Arg Arg Ser Thr Arg Asp
 435 440 445

Arg Arg Ser Pro Ala Glu Pro Glu Gly Gly Pro Ala Ser Glu Gly Ala
 450 455 460

Ala Arg Pro Leu Pro Arg Phe Asn Ser Val Pro Leu Thr Asp Thr Gly
 465 470 475 480

His Glu Arg Gln Ser Glu Gly Ser Ser Ser Pro Gln Leu Gln Glu Ser
 485 490 495

Val Phe His Leu Leu Val Pro Ser Val Ile Leu Val Leu Leu Ala Val
 500 505 510

Gly Gly Leu Leu Phe Tyr Arg Trp Arg Arg Arg Ser His Gln Glu Pro
 515 520 525

Gln Arg Ala Asp Ser Pro Leu Glu Gln Pro Glu Gly Ser Pro Leu Thr
530 535 540

Gln Asp Asp Arg Gln Val Glu Leu Pro Val
545 550
<210> 9
<211> 438
<212> PRT
<213> Mus musculus
<400> 9

Met Thr Ala Pro Gly Ala Ala Gly Arg Cys Pro Pro Thr Thr Trp Leu
 1 5 10 15

Gly Ser Leu Leu Leu Leu Val Cys Leu Leu Ala Ser Arg Ser Ile Thr
 20 25 30

Glu Glu Val Ser Glu Tyr Cys Ser His Met Ile Gly Ser Gly His Leu
 35 40 45

Gln Ser Leu Gln Arg Leu Ile Asp Ser Gln Met Glu Thr Ser Cys Gln
 50 55 60

Ile Thr Phe Glu Phe Val Asp Gln Glu Gln Leu Lys Asp Pro Val Cys
 65 70 75 80

Tyr Leu Lys Lys Ala Phe Leu Leu Val Gln Asp Ile Met Glu Asp Thr
 85 90 95

Met Arg Phe Arg Asp Asn Thr Pro Asn Ala Ile Ala Ile Val Gln Leu
 100 105 110

Gln Glu Leu Ser Leu Arg Leu Lys Ser Cys Phe Thr Lys Asp Tyr Glu
 115 120 125

Glu His Asp Lys Ala Cys Val Arg Thr Phe Tyr Glu Thr Pro Leu Gln
 130 135 140

Leu Leu Glu Lys Val Lys Asn Val Phe Asn Glu Thr Lys Asn Leu Leu
 145 150 155 160

Asp Lys Asp Trp Asn Ile Phe Ser Lys Asn Cys Asn Asn Ser Phe Ala
 165 170 175

Glu Cys Ser Ser Gln Asp Val Val Thr Lys Pro Asp Cys Asn Cys Leu
 180 185 190

Tyr Pro Lys Ala Ile Pro Ser Ser Asp Pro Ala Ser Val Ser Pro His
 195 200 205

Gln Pro Leu Ala Pro Ser Met Ala Pro Val Ala Gly Leu Thr Trp Glu
 210 215 220

Asp Ser Glu Gly Thr Glu Gly Ser Ser Leu Leu Pro Gly Glu Gln Pro
 225 230 235 240

Leu His Thr Val Asp Pro Gly Ser Ala Lys Gln Arg Pro Pro Arg Ser
 245 250 255

Thr Cys Gln Ser Phe Glu Pro Pro Glu Thr Pro Val Val Lys Asp Ser
 260 265 270

Thr Ile Gly Gly Ser Pro Gln Pro Arg Pro Ser Val Gly Ala Phe Asn
 275 280 285

Pro Gly Met Glu Asp Ile Leu Asp Ser Ala Met Gly Thr Asn Trp Val
 290 295 300

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

Thr Glu Leu Ser Pro Ser Arg Pro Gly Gly Gly Ser Met Gln Thr Glu
 325 330 335

Pro Ala Arg Pro Ser Asn Phe Leu Ser Ala Ser Ser Pro Leu Pro Ala
 340 345 350

Ser Ala Lys Gly Gln Gln Pro Ala Asp Val Thr Gly His Glu Arg Gln
 355 360 365

Ser Glu Gly Ser Ser Ser Pro Gln Leu Gln Glu Ser Val Phe His Leu
 370 375 380

Leu Val Pro Ser Val Ile Leu Val Leu Leu Ala Val Gly Gly Leu Leu
 385 390 395 400

Phe Tyr Arg Trp Arg Arg Arg Ser His Gln Glu Pro Gln Arg Ala Asp
 405 410 415

Ser Pro Leu Glu Gln Pro Glu Gly Ser Pro Leu Thr Gln Asp Asp Arg
 420 425 430

Gln Val Glu Leu Pro Val
 435

<210> 10

<211> 441

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 10

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

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

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

Gly Tyr Ile Ser Cys Tyr Asn Gly Asp Thr Asn Tyr Asn Gln Asn Phe
 50 55 60

Lys Gly Lys Ala Thr Phe Thr Val Asp Thr Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80

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

Ala Arg Glu Gly Gly Asn Tyr Pro Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu
 100 105 110

Val Thr Val Ser Ala Ala Lys Thr Thr Pro Pro Ser Val Tyr Pro Leu
 115 120 125

Ala Pro Gly Ser Ala Ala Gln Thr Asn Ser Met Val Thr Leu Gly Cys
 130 135 140

Leu Val Lys Gly Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Thr Trp Asn Ser
 145 150 155 160

Gly Ser Leu Ser Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser
 165 170 175

Asp Leu Tyr Thr Leu Ser Ser Ser Val Thr Val Pro Ser Ser Thr Trp
 180 185 190

Pro Ser Glu Thr Val Thr Cys Asn Val Ala His Pro Ala Ser Ser Thr
 195 200 205

Lys Val Asp Lys Lys Ile Val Pro Arg Asp Cys Gly Cys Lys Pro Cys
 210 215 220

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

<211> 214

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 11

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser His Lys Phe Met Ser Thr Ser Val Gly
 1 5 10 15

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

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

Tyr Trp Thr Ser Thr Arg His Ala Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly
 50 55 60

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

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

Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu 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
 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

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
 210

<210> 12

<211> 449
<212> PRT
<213> Mus musculus
<400> 12

Glu Val Lys Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Thr Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asp Tyr
 20 25 30
 Tyr Met Tyr Trp Val Arg Gln Thr Pro Glu Lys Arg Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ala Tyr Ile Ser Asn Gly Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Pro Asp Thr 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 Arg Leu Lys Ser Glu Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Gln Gly Ser Tyr Gly Tyr Pro Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly
 100 105 110
 Thr Leu Val Thr Val Ser Ala Ala Lys Thr Thr Ala Pro Ser Val Tyr
 115 120 125
 Pro Leu Ala Pro Val Cys Gly Asp Thr Thr Gly Ser Ser Val Thr Leu
 130 135 140
 Gly Cys Leu Val Lys Gly Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Leu Thr Trp
 145 150 155 160
 Asn Ser Gly Ser Leu Ser Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu
 165 170 175
 Gln Ser Asp Leu Tyr Thr Leu Ser Ser Ser Val Thr Val Thr Ser Ser
 180 185 190
 Thr Trp Pro Ser Gln Ser Ile Thr Cys Asn Val Ala His Pro Ala Ser
 195 200 205
 Ser Thr Lys Val Asp Lys Lys Ile Glu Pro Arg Gly Pro Thr Ile Lys
 210 215 220
 Pro Cys Pro Pro Cys Lys Cys Pro Ala Pro Asn Leu Leu Gly Gly Pro
 225 230 235 240
 Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Lys Ile Lys Asp Val Leu Met Ile Ser
 245 250 255

Leu Ser Pro Ile Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Glu Asp Asp
 260 265 270

Pro Asp Val Gln Ile Ser Trp Phe Val Asn Asn Val Glu Val His Thr
 275 280 285

Ala Gln Thr Gln Thr His Arg Glu Asp Tyr Asn Ser Thr Leu Arg Val
 290 295 300

Val Ser Ala Leu Pro Ile Gln His Gln Asp Trp Met Ser Gly Lys Glu
 305 310 315 320

Phe Lys Cys Lys Val Asn Asn Lys Asp Leu Pro Ala Pro Ile Glu Arg
 325 330 335

Thr Ile Ser Lys Pro Lys Gly Ser Val Arg Ala Pro Gln Val Tyr Val
 340 345 350

Leu Pro Pro Pro Glu Glu Glu Met Thr Lys Lys Gln Val Thr Leu Thr
 355 360 365

Cys Met Val Thr Asp Phe Met Pro Glu Asp Ile Tyr Val Glu Trp Thr
 370 375 380

Asn Asn Gly Lys Thr Glu Leu Asn Tyr Lys Asn Thr Glu Pro Val Leu
 385 390 395 400

Asp Ser Asp Gly Ser Tyr Phe Met Tyr Ser Lys Leu Arg Val Glu Lys
 405 410 415

Lys Asn Trp Val Glu Arg Asn Ser Tyr Ser Cys Ser Val Val His Glu
 420 425 430

Gly Leu His Asn His His Thr Thr Lys Ser Phe Ser Arg Thr Pro Gly
 435 440 445

Lys

<210> 13
 <211> 214
 <212> PRT
 <213> Mus musculus
 <400> 13

Ala Ile Gln Met Thr Gln Thr Thr Ser Ser Leu Ser Ala Ser Leu Gly
1 5 10 15
Asp Arg Val Thr Ile Ser Cys Ser Ala Ser Gln Gly Ile Ser Asn Tyr
20 25 30

Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Asp Gly Thr Val Lys Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Tyr Thr Ser Ser Leu His Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Asn Leu Glu Pro
65 70 75 80

Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Ser Lys Leu Pro Trp
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

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

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
210

<210> 14

<211> 522

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 14

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

Ser Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Thr Gly Tyr Ser Ile Thr Ser Asp
 20 25 30

Tyr Ala Trp Asn Trp Ile Arg Gln Phe Pro Gly Asn Lys Leu Glu Trp
 35 40 45

Met Gly Tyr Ile Ser Tyr Ser Gly Ser Thr Ser Tyr Asn Pro Ser Leu
 50 55 60

Lys Ser Arg Ile Ser Ile Thr Arg Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Phe
 65 70 75 80

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

Ala Arg Leu Glu Thr Trp Leu Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr
 100 105 110

Leu Thr Val Ser Ser Ala Lys Thr Thr Pro Pro Ser Val Tyr Pro Leu
 115 120 125

Ala Pro Gly Cys Gly Asp Thr Thr Gly Ser Ser Val Thr Leu Gly Cys
 130 135 140

Leu Val Lys Gly Tyr Phe Pro Glu Ser Val Thr Val Thr Trp Asn Ser
 145 150 155 160

Gly Ser Leu Ser Ser Ser Val His Thr Phe Pro Ala Leu Leu Gln Ser
 165 170 175

Gly Leu Tyr Thr Met Ser Ser Ser Val Thr Val Pro Ser Ser Thr Trp
 180 185 190

Pro Ser Gln Thr Val Thr Cys Ser Val Ala His Pro Ala Ser Ser Thr
 195 200 205

Thr Val Asp Lys Lys Leu Glu Pro Ser Gly Pro Ile Ser Thr Ile Asn
 210 215 220

Pro Cys Pro Pro Cys Lys Glu Cys His Lys Cys Pro Ala Pro Asn Leu
 225 230 235 240

Glu Gly Gly Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Asn Ile Lys Asp Val
 245 250 255

Leu Met Ile Ser Leu Thr Pro Lys Val Thr Cys Val Val Val Asp Val
 260 265 270

Ser Glu Asp Asp Pro Asp Val Gln Ile Ser Trp Phe Val Asn Asn Val
 275 280 285

Glu Val His Thr Ala Gln Thr Gln Thr His Arg Glu Asp Tyr Asn Ser
 290 295 300

Thr Ile Arg Val Val Ser Thr Leu Pro Ile Gln His Gln Asp Trp Met
 305 310 315 320

Ser Gly Lys Glu Phe Lys Cys Lys Val Asn Asn Lys Asp Leu Pro Ser
 325 330 335

Pro Ile Glu Arg Thr Ile Ser Lys Ile Lys Gly Leu Val Arg Ala Pro
 340 345 350

Gln Val Tyr Ile Leu Pro Pro Pro Ala Glu Gln Leu Ser Arg Lys Asp
 355 360 365

Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Val Gly Phe Asn Pro Gly Asp Ile Ser
 370 375 380

Val Glu Trp Thr Ser Asn Gly His Thr Glu Glu Asn Tyr Lys Asp Thr
 385 390 395 400

Ala Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Tyr Phe Ile Tyr Ser Lys Leu
 405 410 415

Asn Met Lys Thr Ser Lys Trp Glu Lys Thr Asp Ser Phe Ser Cys Asn
 420 425 430

Val Arg His Glu Gly Leu Lys Asn Tyr Tyr Leu Lys Lys Thr Ile Ser
 435 440 445

Arg Ser Pro Gly Leu Asp Leu Asp Asp Ile Cys Ala Glu Ala Lys Asp
 450 455 460

Gly Glu Leu Asp Gly Leu Trp Thr Thr Ile Thr Ile Phe Ile Ser Leu
 465 470 475 480

Phe Leu Leu Ser Val Cys Tyr Ser Ala Ser Val Thr Leu Phe Lys Val
 485 490 495

Lys Trp Ile Phe Ser Ser Val Val Glu Leu Lys Gln Lys Ile Ser Pro
 500 505 510

Asp Tyr Arg Asn Met Ile Gly Gln Gly Ala
 515 520

<210> 15
 <211> 214

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 15

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

Glu Arg Val Ser Phe Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Gly Thr Ser
20 25 30

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

Lys Tyr Ala Ser Glu Ser Ile Ser Gly Ile Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

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

Glu Asp Ile Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Asn Ser Trp Pro Thr
85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Trp 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
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

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
210

<210> 16

<211> 5

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 16

Gly Tyr Phe Met His

1 **5**

<210> 17

<211> 5

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 17

Asp Tyr Tyr Met Tyr

1 **5**

<210> 18

<211> 6

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 18

Ser Asp Tyr Ala Trp Asn

1 **5**

<210> 19

<211> 17

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 19

Tyr Ile Ser Cys Tyr Asn Gly Asp Thr Asn Tyr Asn Gln Asn Phe Lys

1 **5** **10** **15**

Gly

<210> 20

<211> 17

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 20

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

1 **5** **10** **15**

Gly

<210> 21

<211> 16

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 21

Tyr Ile Ser Tyr Ser Gly Ser Thr Ser Tyr Asn Pro Ser Leu Lys Ser

1 **5** **10** **15**

<210> 22

<211> 8

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 22

Glu Gly Gly Asn Tyr Pro Ala Tyr

1 **5**

<210> 23

<211> 10

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 23

Gln Gly Ser Tyr Gly Tyr Pro Phe Ala Tyr

1 **5** **10**

<210> 24

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 24

Phe Asp Tyr Ala His Ala Met Asp Tyr

1 **5**

<210> 25

<211> 8

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 25

Leu Glu Thr Trp Leu Phe Asp Tyr

1 **5**

<210> 26

<211> 7

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 26

Asp Tyr Gly Trp Phe Asp Tyr

1 **5**

<210> 27

<211> 11

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 27

Lys Ala Ser Gln Asn Val Gly Thr Ala Val Thr

1 **5** **10**

<210> 28

<211> 11

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 28

Ser Ala Ser Gln Gly Ile Ser Asn Tyr Leu Asn

1 **5** **10**

<210> 29

<211> 11

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 29

Arg Ala Ser Gln Ser Ile Gly Thr Ser Ile His
1 5 10

<210> 30

<211> 7

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 30

Trp Thr Ser Thr Arg His Ala
1 5

<210> 31

<211> 7

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 31

Tyr Thr Ser Ser Leu His Ser
1 5

<210> 32

<211> 7

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 32

Tyr Ala Ser Glu Ser Ile Ser
1 5

<210> 33

<211> 7

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 33

Tyr Thr Ser Glu Ser Ile Ser
1 5

<210> 34

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 34

Gln Gln Tyr Ser Ser Tyr Pro Leu Thr
1 5

<210> 35

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 35

Gln Gln Tyr Ser Lys Leu Pro Trp Thr
1 5

<210> 36

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 36

Gln Gln Ile Asn Ser Trp Pro Thr Thr

1 5

<210> 37
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 37

Gln Gln Ser Asn Ser Trp Pro Thr Thr

1 5

<210> 38
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 38

Gln Gln Tyr Ser Ser Trp Pro Thr Thr

1 5

<210> 39
 <211> 130
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <220>
 <221> característica_misc
 <222> (23)..(23)
 <223> Xaa= qualquer aminoácido
 <220>
 <221> característica_misc
 <222> (27)..(27)
 <223> Xaa= qualquer aminoácido
 <220>
 <221> característica_misc
 <222> (29)..(29)
 <223> Xaa= qualquer aminoácido
 <220>
 <221> característica_misc
 <222> (31)..(36)
 <223> Xaa= qualquer aminoácido
 <220>
 <221> característica_misc
 <222> (51)..(51)
 <223> Xaa= qualquer aminoácido
 <220>
 <221> característica_misc
 <222> (56)..(57)
 <223> Xaa= qualquer aminoácido
 <220>
 <221> característica_misc
 <222> (59)..(59)
 <223> Xaa= qualquer aminoácido
 <220>
 <221> característica_misc
 <222> (61)..(61)

<223> Xaa= qualquer aminoácido
<220>
<221> característica_misc
<222> (84)..(84)
<223> Xaa= qualquer aminoácido
<220>
<221> característica_misc
<222> (86)..(86)
<223> Xaa= qualquer aminoácido
<220>
<221> característica_misc
<222> (101)..(116)
<223> Xaa= qualquer aminoácido
<220>
<221> característica_misc
<222> (119)..(119)
<223> Xaa= qualquer aminoácido
<220>
<221> característica_misc
<222> (125)..(125)
<223> Xaa= qualquer aminoácido
<400> 39

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

Ser Ser

130

<210> 40

<211> 354

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 40

gacgtacaac ttcaagaatc tggcccaggt ctcgtcaaac cttctcaaac tctctcactc 60

acctgcactg ttactgacta ctctattaca tccgactacg cttggaactg gatccgacaa 120

tttctctggta aaaaactcga atggatgggt tatatttctt actctggctc cacctcctac 180

aatccttctc tgaaatcacg catcacaatt tcccgcgata cctctaaaaa tcaattttca 240

ctccaactca attctgttac cgccgccgat actgccacct actactgtgc ctcttttgac 300

tacgctcacg ccatggatta ttggggacag ggtactaccg ttaccgtaag ctca 354

<210> 41

<211> 118

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 41

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

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Thr Asp Tyr Ser Ile Thr Ser Asp
20 25 30

Tyr Ala Trp Asn Trp Ile Arg Gln Phe Pro Gly Lys Lys Leu Glu Trp
35 40 45

Met Gly Tyr Ile Ser Tyr Ser Gly Ser Thr Ser Tyr Asn Pro Ser Leu
50 55 60

Lys Ser Arg Ile Thr Ile Ser Arg Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser
65 70 75 80

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

Ala Ser Phe Asp Tyr Ala His Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110

Thr Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 42

<211> 354

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 42

caagttcaac ttcaagaatc aggccccgga ctogttaaac cctctcaaac tctctctctt 60

acttgcaactg tatccgatta ctctattact tcagactacg cttggaactg gatcagacaa 120

tttcccggaa aaggactcga atggatggga tatatctctt actctggctc aacctcttac 180

aaccctctc tcaaatctcg aataacaatc tcacgcgata cttctaaaaa tcaattctca 240

cttcaactta actccgttac tgccgcccac actgccgttt actactgtgc ttccttcgat 300

tacgcccacg ctatggatta ttggggacaa ggaactaccg tcactgtcag ctca 354

<210> 43

<211> 118

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 43

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

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Asp Tyr Ser Ile Thr Ser Asp
20 25 30

Tyr Ala Trp Asn Trp Ile Arg Gln Phe Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp
35 40 45

Met Gly Tyr Ile Ser Tyr Ser Gly Ser Thr Ser Tyr Asn Pro Ser Leu
50 55 60

Lys Ser Arg Ile Thr Ile Ser Arg Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser
65 70 75 80

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

Ala Ser Phe Asp Tyr Ala His Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110

Thr Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 44

<211> 327

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 44

gaaatagttc ttactcaatc ccccgtaca ctctcagttt ccccaggcga acgcgtcact 60

ttttcttgca gagcatcaca atcaatcggc acttcaattc attggtatca acaaaaaaca 120

ggacaggccc cagcattct tattaaatat gcatacagaac gagccacagg catcccagac 180

agattttcag gttcaggatc aggcaccgat ttcacactta caatatccag agtcgaatca 240

gaagattttg cagattacta ttgtcaacaa ataaacagct ggcccactac attcggacaa 300

ggcacaaaac tcgaaattaa acgtacg 327

<210> 45

<211> 109

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 45

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

Glu Arg Val Thr Phe Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Gly Thr Ser
 20 25 30

Ile His Trp Tyr Gln Gln Lys Thr Gly Gln Ser Pro Arg Leu Leu Ile
 35 40 45

Lys Tyr Ala Ser Glu Arg Ile Ser Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser Gly
 50 55 60

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

Glu Asp Phe Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Gln Ile Asn Ser Trp Pro Thr
 85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Thr
 100 105

<210> 46

<211> 327

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 46

gaaatagttc ttactcaatc ccccgggtaca ctctcagttt ccccaggcga acgcgtcact 60

ttttcttgca gagcatcaca atcaatcggc acttcaattc attggtatca acaaaaaaca 120

ggacaggccc cagcattctt tattaatat gcatcagaac gagccacagg catcccagac 180

agattttcag gttcaggatc aggcaccgat ttcacactta caatatccag agtcgaatca 240

gaagattttg cagattacta ttgtcaacaa ataaacagct ggcccactac attcggacaa 300

ggcacaaaac tcgaaattaa acgtacg 327

<210> 47

<211> 109

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 47

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

Glu Arg Val Thr Phe Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Gly Thr Ser
 20 25 30

Ile His Trp Tyr Gln Gln Lys Thr Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile
 35 40 45

Lys Tyr Ala Ser Glu Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser Gly
 50 55 60

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

Glu Asp Phe Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Gln Ile Asn Ser Trp Pro Thr
 85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Thr
 100 105

<210> 48

<211> 109

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 48

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

Glu Arg Val Ser Phe Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Gly Thr Ser
 20 25 30

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

Lys Tyr Ala Ser Glu Ser Ile Ser Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser Gly
 50 55 60

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

Glu Asp Phe Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Gln Ile Asn Ser Trp Pro Thr
 85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Thr
 100 105

<210> 49

<211> 111

<212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <220>
 <221> característica_misc
 <222> (98)..(98)
 <223> Xaa= qualquer aminoácido
 <400> 49

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

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

Tyr	Leu	Ala	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Pro	Gly	Gln	Ala	Pro	Arg	Leu	Leu
		35					40					45			

Ile	Tyr	Gly	Ala	Ser	Ser	Arg	Ala	Thr	Gly	Ile	Pro	Asp	Arg	Phe	Ser
	50					55					60				

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

Pro	Glu	Asp	Phe	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	Gln	Gln	Tyr	Gly	Ser	Ser	Pro
				85					90					95	

Pro	Xaa	Thr	Phe	Gly	Gln	Gly	Thr	Lys	Val	Glu	Ile	Lys	Arg	Thr
			100					105					110	

<210> 50
 <211> 108
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 50

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

Glu Lys Val Thr Ile Thr Cys Gln Ala Ser Glu Gly Ile Gly Asn Tyr
 20 25 30

Leu Tyr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Asp Gln Ala Lys Leu Leu Ile Lys
 35 40 45

Tyr Ala Ser Gln Ser Ile Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser
 50 55 60

Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Phe Thr Ile Ser Ser Leu Glu Ala Glu
 65 70 75 80
 Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Gly Asn Lys His Pro Leu Thr
 85 90 95

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr
 100 105

<210> 51

<211> 109

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Cadeia leve baixo risco vs. Subgrupo VK6 2-1-(1) A14:

<400> 51

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

Glu Lys Val Thr Phe Thr Cys Gln Ala Ser Gln Ser Ile Gly Thr Ser
 20 25 30

Ile His Trp Tyr Gln Gln Lys Thr Asp Gln Ser Pro Arg Leu Leu Ile
 35 40 45

Lys Tyr Ala Ser Glu Ser Ile Ser Gly Ile Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60

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

Glu Asp Ala Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Gln Ile Asn Ser Trp Pro Thr
 85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Thr
 100 105

<210> 52

<211> 327

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 52

gacatagttc tcacacaatc accagcattc ctctcagtta caccggcgca aaaagtaacc 60

tttacctgtc aggcttctca atctatcggc acttctattc actggtatca acaaaaaacc 120

gatcaagctc ctaaactcct cataaaaatac gcatccgaat ccattctcgg tatccccctcc 180

agattttcag gctccggctc cggcacagat ttcaccctta ccattagctc agttgaagcc 240

gaagacgcag ctgattacta ctgtcaacaa ataaactcat ggcccactac tttcggcggc 300

ggcactaaac tcgaaataaa acgtacg 327

<210> 53

<211> 109

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 53

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

Glu Lys Val Thr Phe Thr Cys Gln Ala Ser Gln Ser Ile Gly Thr Ser
 20 25 30

Ile His Trp Tyr Gln Gln Lys Thr Asp Gln Ala Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45

Lys Tyr Ala Ser Glu Ser Ile Ser Gly Ile Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60

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

Glu Asp Ala Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Gln Ile Asn Ser Trp Pro Thr
 85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Thr
 100 105

<210> 54

<211> 99

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 54

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

Glu Arg Val Ser Phe Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Gly Thr Ser
 20 25 30

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

Lys Tyr Ala Ser Glu Ser Ile Ser Gly Ile Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60

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

Glu Asp Ile Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Gln Ile Asn Ser Trp Pro Thr
 85 90 95

Thr Phe Gly

<210> 55

<211> 95

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 55

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

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

Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45

Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60

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

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Tyr Ser Thr Pro
 85 90 95

<210> 56

<211> 101

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 56

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

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

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

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

Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys
 65 70 75 80

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

Arg Ile Glu Phe Pro
 100

<210> 57

<211> 96

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 57

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

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

Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu
 35 40 45

Ile Tyr Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser
 50 55 60

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

Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Gly Ser Ser Pro
 85 90 95

<210> 58

<211> 101

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 58

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

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

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

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

50						55				60					
Pro	Asp	Arg	Phe	Ser	Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Phe	Thr	Leu	Thr
65					70					75					80
Ile	Ser	Ser	Leu	Gln	Ala	Glu	Asp	Val	Ala	Val.	Tyr	Tyr	Cys	Gln	Gln
				85					90					95	
Tyr	Tyr	Ser	Thr	Pro											
			100												
<210>	59														
<211>	95														
<212>	PRT														
<213>	Homo sapiens														
<400>	59														
Glu	Thr	Thr	Leu	Thr	Gln	Ser	Pro	Ala	Phe	Met	Ser	Ala	Thr	Pro	Gly
1				5					10					15	
Asp	Lys	Val	Asn	Ile	Ser	Cys	Lys	Ala	Ser	Gln	Asp	Ile	Asp	Asp	Asp
			20					25					30		
Met	Asn	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Pro	Gly	Glu	Ala	Ala	Ile	Phe	Ile	Ile
		35					40					45			
Gln	Glu	Ala	Thr	Thr	Leu	Val	Pro	Gly	Ile	Pro	Pro	Arg	Phe	Ser	Gly
	50					55					60				
Ser	Gly	Tyr	Gly	Thr	Asp	Phe	Thr	Leu	Thr	Ile	Asn	Asn	Ile	Glu	Ser
65					70					75					80
Glu	Asp	Ala	Ala	Tyr	Tyr	Phe	Cys	Leu	Gln	His	Asp	Asn	Phe	Pro	
				85					90					95	
<210>	60														
<211>	95														
<212>	PRT														
<213>	Homo sapiens														
<400>	60														
Glu	Ile	Val	Leu	Thr	Gln	Ser	Pro	Asp	Phe	Gln	Ser	Val	Thr	Pro	Lys
1				5					10					15	
Glu	Lys	Val	Thr	Ile	Thr	Cys	Arg	Ala	Ser	Gln	Ser	Ile	Gly	Ser	Ser
			20					25					30		
Leu	His	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Pro	Asp	Gln	Ser	Pro	Lys	Leu	Leu	Ile
		35					40					45			

Lys Tyr Ala Ser Gln Ser Phe Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60

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

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

<210> 61

<211> 52

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 61

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

Glu Arg Val Ser Phe Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Gly Thr Ser
 20 25 30

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

Lys Tyr Ala Ser
 50

<210> 62

<211> 57

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<221> característica_misc

<222> (31)..(33)

<223> Xaa= qualquer aminoácido

<220>

<221> característica_misc

<222> (36)..(37)

<223> Xaa= qualquer aminoácido

<220>

<221> característica_misc

<222> (39)..(39)

<223> Xaa= qualquer aminoácido

<220>

<221> característica_misc

<222> (55)..(55)

<223> Xaa= qualquer aminoácido

<400> 62

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Leu Val Xaa Xaa
 20 25 30

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

Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Xaa Ala Ser
 50 55

<210> 63

<211> 58

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<221> característica_misc

<222> (33)..(33)

<223> Xaa= qualquer aminoácido

<220>

<221> característica_misc

<222> (36)..(37)

<223> Xaa= qualquer aminoácido

<220>

<221> característica_misc

<222> (56)..(57)

<223> Xaa= qualquer aminoácido

<400> 63

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

Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Leu His Ser
 20 25 30

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

Ser Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Xaa Xaa Ser
 50 55

<210> 64

<211> 53

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 64

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

<400> 67

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

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

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

Ser Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Thr Leu Ser
 50 55

<210> 68

<211> 53

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 68

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

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

Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu
 35 40 45

Ile Tyr Gly Ala Ser
 50

<210> 69

<211> 58

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 69

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

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

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

Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser
 50 55

<210> 70

<211> 52

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 70

Glu Thr Thr Leu Thr Gln Ser Pro Ala Phe Met Ser Ala Thr Pro Gly
1 5 10 15

Asp Lys Val Asn Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gln Asp Ile Asp Asp Asp
20 25 30

Met Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Glu Ala Ala Ile Phe Ile Ile
35 40 45

Gln Glu Ala Thr
50

<210> 71

<211> 52

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 71

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Asp Phe Gln Ser Val Thr Pro Lys
1 5 10 15

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

Leu His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Asp Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

Lys Tyr Ala Ser
50

<210> 72

<211> 57

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 72

Glu Ser Ile Ser Gly Ile Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly
1 5 10 15

Thr Asp Phe Thr Leu Ser Ile Asn Ser Val Glu Ser Glu Asp Ile Ala
20 25 30

Asp Tyr Tyr Cys Gln Gln Ile Asn Ser Trp Pro Thr Thr Phe Gly Gly
35 40 45

Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Ala
50 55

<210> 73

<211> 58

```

<212> PRT
<213> Homo sapiens
<220>
<221> característica_misc
<222> (1)..(1)
<223> Xaa= qualquer aminoácido
<220>
<221> característica_misc
<222> (3)..(3)
<223> Xaa= qualquer aminoácido
<220>
<221> característica_misc
<222> (39)..(42)
<223> Xaa= qualquer aminoácido
<220>
<221> característica_misc
<222> (45)..(45)
<223> Xaa= qualquer aminoácido
<400> 73
Xaa Leu Xaa Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly
1 5 10 15

Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala
20 25 30

Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Xaa Xaa Xaa Xaa Pro Glu Xaa Thr Phe Gly
35 40 45

Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr
50 55
<210> 74
<211> 58
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<220>
<221> característica_misc
<222> (3)..(3)
<223> Xaa= qualquer aminoácido
<220>
<221> característica_misc
<222> (40)..(40)
<223> Xaa= qualquer aminoácido
<220>
<221> característica_misc
<222> (42)..(42)
<223> Xaa= qualquer aminoácido
<220>
<221> característica_misc
<222> (45)..(45)
<223> Xaa= qualquer aminoácido

```

<400> 74

Asn Arg Xaa Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly
 1 5 10 15

Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly
 20 25 30

Val Tyr Tyr Cys Met Gln Ala Xaa Gln Xaa Pro Arg Xaa Thr Phe Gly
 35 40 45

Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr
 50 55

<210> 75

<211> 58

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<221> característica_misc

<222> (45)..(45)

<223> Xaa= qualquer aminoácido

<400> 75

Ser Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly
 1 5 10 15

Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala
 20 25 30

Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Gly Ser Ser Pro Pro Xaa Thr Phe Gly
 35 40 45

Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr
 50 55

<210> 76

<211> 57

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<221> característica_misc

<222> (44)..(44)

<223> Xaa= qualquer aminoácido

<400> 76

Thr Arg Glu Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly
 1 5 10 15

Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala
 20 25 30

Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Tyr Ser Thr Pro Xaa Thr Phe Gly Gln
 35 40 45

Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr
 50 55

<210> 77

<211> 57

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 77

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

Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala
 20 25 30

Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Tyr Ser Thr Pro Leu Thr Phe Gly Gly
 35 40 45

Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr
 50 55

<210> 78

<211> 57

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 78

Tyr Arg Ala Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly
 1 5 10 15

Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly
 20 25 30

Val Tyr Tyr Cys Met Gln Arg Ile Glu Phe Pro Leu Thr Phe Gly Gly
 35 40 45

Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr
 50 55

<210> 79

<211> 57

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 79

Ser Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly
1 5 10 15

Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala
20 25 30

Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Gly Ser Ser Pro Leu Thr Phe Gly Gly
35 40 45

Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr
50 55

<210> 80

<211> 57

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 80

Thr Arg Glu Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly
1 5 10 15

Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala
20 25 30

Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Tyr Ser Thr Pro Leu Thr Phe Gly Gly
35 40 45

Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr
50 55

<210> 81

<211> 57

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 81

Thr Leu Val Pro Gly Ile Pro Pro Arg Phe Ser Gly Ser Gly Tyr Gly
1 5 10 15

Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Asn Asn Ile Glu Ser Glu Asp Ala Ala
20 25 30

Tyr Tyr Phe Cys Leu Gln His Asp Asn Phe Pro Leu Thr Phe Gly Gly
35 40 45

Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr
50 55

<210> 82

<211> 57

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 82

Gln Ser Phe Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly
 1 5 10 15

Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Asn Ser Leu Glu Ala Glu Asp Ala Ala
 20 25 30

Thr Tyr Tyr Cys His Gln Ser Ser Ser Leu Pro Leu Thr Phe Gly Gly
 35 40 45

Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr
 50 55

<210> 83

<211> 101

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 83

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

Ser Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Thr Asp Tyr Ser Ile Thr Ser Asp
 20 25 30

Tyr Ala Trp Asn Trp Ile Arg Gln Phe Pro Gly Asn Lys Leu Glu Trp
 35 40 45

Met Gly Tyr Ile Ser Tyr Ser Gly Ser Thr Ser Tyr Asn Pro Ser Leu
 50 55 60

Lys Ser Arg Ile Ser Ile Thr Arg Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Phe
 65 70 75 80

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

Ala Ser Phe Asp Tyr
 100

<210> 84

<211> 98

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 84

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

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

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

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

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

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

Ala Arg

<210> 85

<211> 100

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 85

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

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

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

Trp Leu Ala Leu Ile Tyr Trp Asn Asp Asp Lys Arg Tyr Ser Pro Ser
50 55 60

Leu Lys Ser Arg Leu Thr Ile Thr Lys Asp Thr Ser Lys Asn Gln Val
65 70 75 80

Val Leu Thr Met Thr Asn Met Asp Pro Val Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr
85 90 95

Cys Ala His Arg

100

<210> 86

<211> 98

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 86

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

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

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

Ala Asn Ile Lys Gln Asp Gly Ser Glu Lys Tyr Tyr Val Asp Ser Val
 50 55 60

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

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

Ala Arg

<210> 87

<211> 98

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 87

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

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ala Val Ser Gly Gly Ser Ile Ser Ser Ser
 20 25 30

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

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

Lys Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Lys Ser Lys Asn Gln Phe Ser
 65 70 75 80

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

Ala Arg

<210> 88

<211> 98

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 88

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 Ser Tyr
 20 25 30

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

Gly Ile Ile Tyr Pro Gly Asp Ser Asp Thr Arg Tyr Ser Pro Ser Phe
 50 55 60

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

Leu Gln Trp Ser Ser Leu Lys Ala Ser Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys
 85 90 95

Ala Arg

<210> 89

<211> 101

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 89

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

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ala Ile Ser Gly Asp Ser Val Ser Ser Asn
20 25 30

Ser Ala Ala Trp Asn Trp Ile Arg Gln Ser Pro Ser Arg Gly Leu Glu
35 40 45

Trp Leu Gly Arg Thr Tyr Tyr Arg Ser Lys Trp Tyr Asn Asp Tyr Ala
50 55 60

Val Ser Val Lys Ser Arg Ile Thr Ile Asn Pro Asp Thr Ser Lys Asn
65 70 75 80

Gln Phe Ser Leu Gln Leu Asn Ser Val Thr Pro Glu Asp Thr Ala Val
85 90 95

Tyr Tyr Cys Ala Arg
100

<210> 90

<211> 98

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 90

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

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

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

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

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

Leu Gln Ile Cys Ser Leu Lys Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95

Ala Arg

<210> 91

<211> 58

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 91

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

Ser Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Thr Asp Tyr Ser Ile Thr Ser Asp
 20 25 30

Tyr Ala Trp Asn Trp Ile Arg Gln Phe Pro Gly Asn Lys Leu Glu Trp
 35 40 45

Met Gly Tyr Ile Ser Tyr Ser Gly Ser Thr
 50 55

<210> 92

<211> 59

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<221> característica_misc

<222> (1)..(1)

<223> Xaa= qualquer aminoácido

<220>

<221> característica_misc

<222> (16)..(16)
 <223> Xaa= qualquer aminoácido
 <220>
 <221> característica_misc
 <222> (30)..(30)
 <223> Xaa= qualquer aminoácido
 <220>
 <221> característica_misc
 <222> (33)..(33)
 <223> Xaa= qualquer aminoácido
 <220>
 <221> característica_misc
 <222> (35)..(35)
 <223> Xaa= qualquer aminoácido
 <220>
 <221> característica_misc
 <222> (50)..(50)
 <223> Xaa= qualquer aminoácido
 <220>
 <221> característica_misc
 <222> (52)..(52)
 <223> Xaa= qualquer aminoácido
 <220>
 <221> característica_misc
 <222> (55)..(56)
 <223> Xaa= qualquer aminoácido
 <220>
 <221> característica_misc
 <222> (58)..(58)
 <223> Xaa= qualquer aminoácido
 <400> 92

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

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

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

Gly Xaa Ile Xaa Pro Tyr Xaa Xaa Gly Xaa Thr
50 55

<210> 93
 <211> 62
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <220>
 <221> característica_misc
 <222> (23)..(23)
 <223> Xaa= qualquer aminoácido

<220>
 <221> característica_misc
 <222> (27)..(27)
 <223> Xaa= qualquer aminoácido
 <220>
 <221> característica_misc
 <222> (29)..(29)
 <223> Xaa= qualquer aminoácido
 <220>
 <221> característica_misc
 <222> (32)..(37)
 <223> Xaa= qualquer aminoácido
 <220>
 <221> característica_misc
 <222> (52)..(52)
 <223> Xaa= qualquer aminoácido
 <220>
 <221> característica_misc
 <222> (58)..(59)
 <223> Xaa= qualquer aminoácido
 <220>
 <221> característica_misc
 <222> (61)..(61)
 <223> Xaa= qualquer aminoácido
 <400> 93

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

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Xaa Val Ser Gly Xaa Ser Xaa Ser Ser Xaa
20 25 30

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu
35 40 45

Trp Ile Gly Xaa Ile Tyr Tyr Arg Ala Xaa Xaa Gly Xaa Thr
50 55 60

<210> 94
 <211> 60
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <220>
 <221> característica_misc
 <222> (31)..(31)
 <223> Xaa= qualquer aminoácido
 <220>
 <221> característica_misc
 <222> (33)..(33)
 <223> Xaa= qualquer aminoácido
 <220>
 <221> característica_misc

<222> (35)..(35)
 <223> Xaa= qualquer aminoácido
 <220>
 <221> característica_misc
 <222> (49)..(50)
 <223> Xaa= qualquer aminoácido
 <220>
 <221> característica_misc
 <222> (52)..(53)
 <223> Xaa= qualquer aminoácido
 <220>
 <221> característica_misc
 <222> (55)..(56)
 <223> Xaa= qualquer aminoácido
 <220>
 <221> característica_misc
 <222> (58)..(59)
 <223> Xaa= qualquer aminoácido
 <400> 94

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

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

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

Xaa Xaa Ile Xaa Xaa Lys Xaa Xaa Gly Xaa Xaa Thr
 50 55 60

<210> 95

<211> 58

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 95

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

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

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

Gly Trp Ile Asn Pro Asn Ser Gly Gly Thr
 50 55

<210> 96

<211> 59

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 96

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

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

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

Trp Leu Ala Leu Ile Tyr Trp Asn Asp Asp Lys
 50 55

<210> 97

<211> 58

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 97

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

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

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

Ala Asn Ile Lys Gln Asp Gly Ser Glu Lys
 50 55

<210> 98

<211> 58

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 98

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

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ala Val Ser Gly Gly Ser Ile Ser Ser Ser
 20 25 30

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

Ile Gly Glu Ile Tyr His Ser Gly Ser Thr
 50 55

<210> 99

<211> 58

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 99

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	Ser	Tyr
			20					25					30		

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

Gly	Ile	Ile	Tyr	Pro	Gly	Asp	Ser	Asp	Thr
	50					55			

<210> 100

<211> 61

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 100

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

Thr	Leu	Ser	Leu	Thr	Cys	Ala	Ile	Ser	Gly	Asp	Ser	Val	Ser	Ser	Asn
			20					25					30		

Ser	Ala	Ala	Trp	Asn	Trp	Ile	Arg	Gln	Ser	Pro	Ser	Arg	Gly	Leu	Glu
		35					40					45			

Trp	Leu	Gly	Arg	Thr	Tyr	Tyr	Arg	Ser	Lys	Trp	Tyr	Asn
	50					55					60	

<210> 101

<211> 58

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 101

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

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

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

Gly Trp Ile Asn Thr Asn Thr Gly Asn Pro
 50 55

<210> 102

<211> 60

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 102

Ser Tyr Asn Pro Ser Leu Lys Ser Arg Ile Ser Ile Thr Arg Asp Thr
 1 5 10 15

Ser Lys Asn Gln Phe Phe Leu Gln Leu Asn Ser Val Thr Thr Glu Asp
 20 25 30

Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala Ser Phe Asp Tyr Ala His Ala Met Asp
 35 40 45

Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser
 50 55 60

<210> 103

<211> 70

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<221> característica_misc

<222> (14)..(14)

<223> Xaa= qualquer aminoácido

<220>

<221> característica_misc

<222> (16)..(16)

<223> Xaa= qualquer aminoácido

<220>

<221> característica_misc

<222> (31)..(31)

<223> Xaa= qualquer aminoácido

<220>

<221> característica_misc

<222> (41)..(53)

<223> Xaa= qualquer aminoácido

<220>

```

<221> característica_misc
<222> (55)..(56)
<223> Xaa= qualquer aminoácido
<220>
<221> característica_misc
<222> (59)..(59)
<223> Xaa= qualquer aminoácido
<400> 103
Asn Tyr Ala Gln Lys Phe Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Xaa Asp Xaa
1 5 10 15

Ser Thr Ser Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Xaa Asp
20 25 30

Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
35 40 45
Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Asp Xaa Xaa Phe Asp Xaa Trp Gly Gln Gly Thr
50 55 60

Leu Val Thr Val Ser Ser
65 70
<210> 104
<211> 70
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<220>
<221> característica_misc
<222> (1). (1)
<223> Xaa= qualquer aminoácido
<220>
<221> característica_misc
<222> (24)..(24)
<223> Xaa= qualquer aminoácido
<220>
<221> característica_misc
<222> (26)..(26)
<223> Xaa= qualquer aminoácido
<220>
<221> característica_misc
<222> (41)..(56)
<223> Xaa= qualquer aminoácido
<220>
<221> característica_misc
<222> (59)..(59)
<223> Xaa= qualquer aminoácido
<220>
<221> característica_misc
<222> (65)..(65)
<223> Xaa= qualquer aminoácido
<400> 104

```

Xaa Tyr Asn Pro Ser Leu Lys Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr
 1 5 10 15

Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu Xaa Leu Xaa Ser Val Thr Ala Ala Asp
 20 25 30

Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 35 40 45

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Phe Asp Xaa Trp Gly Gln Gly Thr
 50 55 60

Xaa Val Thr Val Ser Ser
 65 70

<210> 105

<211> 70

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<221> característica_misc

<222> (40)..(52)

<223> Xaa= qualquer aminoácido

<220>

<221> característica_misc

<222> (55)..(56)

<223> Xaa= qualquer aminoácido

<220>

<221> característica_misc

<222> (59)..(59)

<223> Xaa= qualquer aminoácido

<400> 105

Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn
 1 5 10 15

Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp
 20 25 30

Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 35 40 45

Xaa Xaa Xaa Xaa Tyr Tyr Xaa Xaa Phe Asp Xaa Trp Gly Gln Gly Thr
 50 55 60

Leu Val Thr Val Ser Ser
 65 70

<210> 106

<211> 70
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <220>
 <221> característica_misc
 <222> (41)..(55)
 <223> Xaa= qualquer aminoácido
 <400> 106

Asn	Tyr	Ala	Gln	Lys	Phe	Gln	Gly	Arg	Val	Thr	Met	Thr	Arg	Asp	Thr
1				5					10					15	
Ser	Ile	Ser	Thr	Ala	Tyr	Met	Glu	Leu	Ser	Arg	Leu	Arg	Ser	Asp	Asp
			20					25					30		

Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	Ala	Arg	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa
		35					40					45			

Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Tyr	Phe	Asp	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr
50						55					60				

Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser
65					70

<210> 107
 <211> 70
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <220>
 <221> característica_misc
 <222> (42)..(55)
 <223> Xaa= qualquer aminoácido
 <400> 107

Arg	Tyr	Ser	Pro	Ser	Leu	Lys	Ser	Arg	Leu	Thr	Ile	Thr	Lys	Asp	Thr
1				5					10					15	

Ser	Lys	Asn	Gln	Val	Val	Leu	Thr	Met	Thr	Asn	Met	Asp	Pro	Val	Asp
			20					25					30		

Thr	Ala	Thr	Tyr	Tyr	Cys	Ala	His	Arg	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa
		35					40					45			

Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Tyr	Phe	Asp	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr
50						55					60				

Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser
65					70

<210> 108
 <211> 70
 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<221> característica_misc

<222> (41)..(55)

<223> Xaa= qualquer aminoácido

<400> 108

Tyr Tyr Val Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn
1 5 10 15

Ala Lys Asn Ser Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp
20 25 30

Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
35 40 45

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
50 55 60

Leu Val Thr Val Ser Ser
65 70

<210> 109

<211> 70

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<221> característica_misc

<222> (41)..(55)

<223> Xaa= qualquer aminoácido

<400> 109

Asn Tyr Asn Pro Ser Leu Lys Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Lys
1 5 10 15

Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp
20 25 30

Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
35 40 45

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
50 55 60

Leu Val Thr Val Ser Ser
65 70

<210> 110

<211> 70

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<221> característica_misc

<222> (41)..(55)

<223> Xaa= qualquer aminoácido

<400> 110

Arg Tyr Ser Pro Ser Phe Gln Gly Gln Val Thr Ile Ser Ala Asp Lys
1 5 10 15

Ser Ile Ser Thr Ala Tyr Leu Gln Trp Ser Ser Leu Lys Ala Ser Asp
20 25 30

Thr Ala Met Tyr Tyr Cys Ala Arg Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
35 40 45

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
50 55 60

Leu Val Thr Val Ser Ser
65 70

<210> 111

<211> 70

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<221> característica_misc

<222> (41)..(55)

<223> Xaa= qualquer aminoácido

<400> 111

Asp Tyr Ala Val Ser Val Lys Ser Arg Ile Thr Ile Asn Pro Asp Thr
1 5 10 15

Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu Gln Leu Asn Ser Val Thr Pro Glu Asp
20 25 30

Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
35 40 45

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
50 55 60

Leu Val Thr Val Ser Ser
65 70

<210> 112

<211> 70

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<221> característica_misc

<222> (41)..(55)

<223> Xaa= qualquer aminoácido

<400> 112

Thr Tyr Ala Gln Gly Phe Thr Gly Arg Phe Val Phe Ser Leu Asp Thr
1 5 10 15

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

Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
35 40 45

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
50 55 60

Leu Val Thr Val Ser Ser
65 70

<210> 113

<211> 1404

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 113

```

atgggatgga gttgcattat acttttctctc gttgocaccg ccaactggagt tcaactctgac      60
gtacaacttc aagaatctgg cccaggtctc gtcaaacctt ctcaaactct ctcaactcacc      120
tgcactgtta ctgactactc tattacatcc gactacgctt ggaactggat ccgacaattt      180
cctggtaaaa aactcgaatg gatgggttat atttcttact ctggctccac ctctacaat      240
ccttctctga aatcaagcat cacaatttcc cgcgatacct ctaaaaatca attttcactc      300
caactcaatt ctgttaccgc cgcgatact gccacctact actgtgcctc ttttgactac      360
gctcacgcca tggattattg gggacagggg actaccgtta ccgtaagctc agccagcaca      420
aaggggccat cggctctccc cctggcacc cctccaaga gcacctctgg gggcacagcg      480
gccctgggct gcctgggcaa ggactacttc cccgaaccgg tgacgggtgc gtggaactca      540
ggcgccctga ccagcggcgt gcacaccttc ccgctgtcc tacagtctc aggactctac      600
tccctcagca gcgtgggtgac cgtgcctcc agcagcttg gcacccagac ctacatctgc      660
aacgtgaatc acaagcccag caacaccaag gtggacaaga gagttgagcc caaatcttgt      720
gacaaaactc acacatgtcc accgtgccc aacacctgaac tcttgggggg accgtcagtc      780
ttctcttcc ccccaaaacc caaggacacc ctcatgatct cccggacccc tgaggtcaca      840
tgcgtgggtg tggacgtgag ccacgaagac cctgaggtca agttcaactg gtacgtggac      900
ggcgtggagg tgcataatgc caagacaaag ccgcgggagg agcagtacaa cagcacgtac      960
cgtgtgggtc gcgtctctac cgtctctgac caggactggc tgaatggcaa ggagtacaag     1020
tgcaaggtct ccaacaaagc cctcccagcc cccatcgaga aaaccatctc caaagccaaa     1080
gggcagcccc gagaaccaca ggtgtacacc ctgccccat cccgggagga gatgaccaag     1140
aaccaggtca gcctgacctg cctgggtcaaa ggcttctatc ccagcgacat cgcctgggag     1200
tgggagagca atgggcagcc ggagaacaac tacaagacca cgcctcccgt gctggactcc     1260
gacggctcct tcttctctta tagcaagctc accgtggaca agagcaggtg gcagcagggg     1320
aacgtcttct catgctccgt gatgcatgag gctctgcaca accactacac gcagaagagc     1380
ctctccctgt ccccggttaa atga                                             1404
<210> 114
<211> 467
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 114

```

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

Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val
 165 170 175

Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala
 180 185 190

Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val
 195 200 205

Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His
 210 215 220

Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys
 225 230 235 240

Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly
 245 250 255

Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met
 260 265 270

Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His
 275 280 285

Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val
 290 295 300

His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr
 305 310 315 320

Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly
 325 330 335

Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile
 340 345 350

Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val
 355 360 365

Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser
 370 375 380

Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu
 385 390 395 400

Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro
 405 410 415

Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val
 420 425 430

Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met
 435 440 445

His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser
 450 455 460

Pro Gly Lys

465

<210> 115

<211> 1404

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 115

atggggttggg cttgcatcat tctctttctc gtcgctaccg caactgggtg acactcccaa 60
 gttcaacttc aagaatcagg ccccgactc gttaaaccct ctcaaactct ctctcttact 120
 tgcactgtat ccgattactc tattacttca gactacgctt ggaactggat cagacaattt 180
 cccggaaaag gactcgaatg gatgggatat atctcttact ctggctcaac ctcttacaac 240
 ccctctctca aatctcgaat aacaatctca cgcgatactt ctaaaaatca attctcaett 300
 caacttaact ccgttactgc cggcgacact gccgittact actgtgcttc cttecgattac 360
 gccacagcta tggattattg gggacaagga actaccgtca ctgtcagctc agccagcaca 420
 aagggcccat cggctctccc cctggcacc cctccaaga gcacctctgg gggcacagcg 480
 gccctgggct gcctgggtcaa ggactacttc cccgaaccgg tgacgggtgtc gtggaactca 540
 ggcgccctga ccagcggcgt gcacaccttc ccggctgtcc tacagtcctc aggactctac 600
 tccctcagca gcgtgggtgac cgtgccctcc agcagcttgg gcacccagac ctacatctgc 660
 aacgtgaatc acaagcccag caacaccaag gtggacaaga gagttgagcc caaatcttgt 720
 gacaaaactc acacatgtcc accgtgcccga gcacctgaac tcttgggggg accgtcagtc 780
 ttctcttcc ccccaaaacc caaggacacc ctcatgatct cccggacccc tgaggtcaca 840
 tgcgtgggtg tggacgtgag ccacgaagac cctgaggtca agttcaactg gtacgtggac 900
 ggcgtggagg tgcataatgc caagacaaag ccgcgggagg agcagtacaa cagcacgtac 960
 cgtgtgggtca gcgtcctcac cgtcctgcac caggactggc tgaatggcaa ggagtacaag 1020
 tgcaaggtct ccaacaaagc cctcccagcc cccatcgaga aaaccatctc caaagccaaa 1080
 gggcagcccc gagaaccaca ggtgtacacc ctgcccccat cccgggagga gatgaccaag 1140
 aaccaggtca gcctgaectg cctgggtcaa ggcttctatc ccagcgacat cgccgtggag 1200
 tgggagagca atgggcagcc ggagaacaac tacaagacca cgcctcccgt gctggactcc 1260

gacggctcct tcttctctta tagcaagctc accgtggaca agagcaggtg gcagcagggg 1320

aacgtcttct catgctccgt gatgcatgag gctctgcaca accactacac gcagaagagc 1380

ctctccctgt ccccggttaa atga 1404

<210> 116

<211> 467

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 116

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

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

His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser
 450 455 460

Pro Gly Lys

465

<210> 117

<211> 2002

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 117

```

atgggatgga gttgcattat acttttcttc gttgccaccg ccoactggagt tcactctgac      60
gtacaacttc aagaatctgg cccaggcttc gtcaaacctt ctcaaaactct ctcaactcacc    120
tgcaactgta ctgactactc tattacatcc gactacgctt ggaactggat ccgacaattt    180
cctggtaaaa aactcgaatg gatgggttat atttcttact ctggctccac ctcttacaat    240
ccttctctga aatcacgcat cacaatttcc cgcgatacct ctaaaaatca attttcaactc    300
caactcaatt ctgttaccgc cgcgataact gccacctact actgtgcctc ttttgactac    360
gctcacgcca tggattattg gggacagggg actaccgta ccgtaagctc agccagcaca    420
aagggcccat ccgtcttccc cctggcgccc tgctccagga gcacctccga gagcacagcc    480
gccctgggct gcctgggcaa ggactacttc cccgaaccgg tgacgggtgc gtggaactca    540
ggcgccctga ccagcggcgt gcacaccttc ccggctgtcc tacagtccctc aggactctac    600
tccctcagca gcgtggtgac cgtgccctcc agcagcttgg gcacgaagac ctacacctgc    660
aacgtagatc acaagcccag caacaccaag gtggacaaga gagttggtga gaggccagca    720
cagggagggg ggggtgtctgc tgggaagccag gctcagccct cctgcctgga cgcacccccg    780
ctgtgcagcc ccagcccagg gcagcaaggc atgccccatc tgtctctctca cccggaggcc    840
tctgaccacc ccaactcatgc tcagggagag ggtcttctgg atttttccac caggctccgg    900
gcagccacag gctggatgcc cctaccccag gccctgcgca tacaggggca ggtgctgcgc    960
tcagacctgc caagagccat atccgggagg acctgcccc tgacctaaagc ccacccccaaa  1020
ggccaaactc tccactccct cagctcagac accttctctc ctcccagatc tgagtaactc  1080
ccaatcttct ctctgcagag tccaaatatg gtcccccatg cccatcatgc ccaggtaagc  1140
caaccaggc ctcgccctcc agtcaaggc gggacaggtg ccctagagta gcctgcatcc  1200
agggacaggc cccagccggg tgetgacgca tccacctoca tctcttctc agcacctgag  1260
ttctggggg gaccatcagt ctctctgttc cccccaaaac ccaaggacac tctcatgatc  1320
tcccgacccc ctgaggtcac gtgcgtgggt gtggacgtga gccaggaaga ccccgaggtc  1380
cagttcaact ggtacgtgga tggcgtggag gtgcataatg ccaagacaaa gccgcgggag  1440
gagcagttca acagcacgta ccgtgtggtc agcgtctctc ccgtctgca ccaggactgg  1500

```

ctgaacggca aggagtacaa gtgcaaggtc tccaacaaag gcctcccgtc ctccatcgag 1560
 aaaaccatct ccaaagccaa aggtgggacc cacgggggtgc gagggccaca tggacagagg 1620
 tcagctcggc ccaccctctg ccctgggagt gaccgctgtg ccaacctctg tccctacagg 1680
 gcagccccga gagccacagg tgtacaccct gccccatcc caggaggaga tgaccaagaa 1740
 ccaggtcagc ctgacctgcc tgggtcaaagg cttctacccc agcgacatcg ccgtggagtg 1800
 ggagagcaat gggcagccgg agaacaacta caagaccacg cctcccgtgc tggactccga 1860
 cggctccttc ttctctaca gcaggctaac cgtggacaag agcaggtggc aggaggggaa 1920
 tgtcttctca tgctccgtga tgcattgaggc tctgcacaac cactacacac agaagagcct 1980
 ctccctgtct ctgggtaaat ga 2002
 <210> 118
 <211> 1395
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens
 <400> 118
 atgggatgga gttgcattat acttttcttc gttgccacog ccaactggagt tcactctgac 60
 gtacaacttc aagaatctgg ccaggtctc gtcaaactt ctcaaactct ctcaactcacc 120
 tgcactgtta ctgactactc tattacatcc gactacgctt ggaactggat ccgacaattt 180
 cctggtaaaa aactcgaatg gatgggttat atttcttact ctggctccac ctcttacaat 240
 ccttctctga aatcacgcat cacaatttcc cgcgatacct ctaaaaatca attttcactc 300
 caactcaatt ctgttacogc cgcgatact gccacctact actgtgcctc ttttgactac 360
 gctcacgcca tggattattg gggacagggg actaccgtta ccgtaagctc agccagcaca 420
 aagggcccat ccgtcttccc cctggcgccc tgctccagga gcacctccga gagcacagcc 480
 gccttgggtc gcctgggtcaa ggactacttc cccgaaccgg tgacgggtgc gtggaactca 540
 ggcgcccctga ccagcggcgt gcacacctc ccggctgtcc tacagtcctc aggactctac 600
 tccctcagca gcgtgggtgac cgtgcccctc agcagcttgg gcacgaagac ctacacctgc 660
 aacgtagatc acaagcccag caacaccaag gtggacaaga gagttgagtc caaatatggt 720
 cccccatgcc catcatgccc agcacctgag ttcttggggg gaccatcagt ctctctgttc 780
 cccccaaaac ccaaggacac tctcatgatc tcccggacct ctgaggtcac gtgcgtgggtg 840
 gtggacgtga gccaggaaga ccccaggtc cagttcaact ggtacgtgga tggcgtggag 900
 gtgcataatg ccaagacaaa gccgcggggag gagcagttca acagcacgta ccgtgtggtc 960
 agcgtcctca ccgtcctgca ccaggactgg ctgaacggca aggagtacaa gtgcaaggtc 1020
 tccaacaaag gcctcccgtc ctccatcgag aaaaccatct ccaaagccaa agggcagccc 1080
 cgagagccac aggtgtacac cctgccccca tcccaggagg agatgaccaa gaaccaggtc 1140

```
agcctgacct gcctgggtcaa aggcttctac cccagegaca tcgccgtgga gtgggagagc 1200
aatgggcagc cggagaacaa ctacaagacc acgcctcccg tgctggactc cgacggctcc 1260
ttcttctctt acagcaggct aaccgtggac aagagcaggt ggcaggaggg gaatgtcttc 1320
tcatgctccg tgatgcatga ggctctgcac aaccactaca cacagaagag cctctccctg 1380
tctctgggta aatga 1395
<210> 119
<211> 464
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 119
```

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

			180					185					190			
Val	Leu	Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val	
		195					200					205				
Pro	Ser	Ser	Ser	Leu	Gly	Thr	Lys	Thr	Tyr	Thr	Cys	Asn	Val	Asp	His	
	210					215					220					
Lys	Pro	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Arg	Val	Glu	Ser	Lys	Tyr	Gly	
225					230					235					240	
Pro	Pro	Cys	Pro	Ser	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Phe	Leu	Gly	Gly	Pro	Ser	
				245					250					255		
Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	
			260					265					270			
Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	Gln	Glu	Asp	Pro	
		275					280					285				
Glu	Val	Gln	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	
	290					295					300					
Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Phe	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	Val	
305					310					315					320	
Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	
				325					330					335		
Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Gly	Leu	Pro	Ser	Ser	Ile	Glu	Lys	Thr	
			340					345					350			
Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	
		355					360					365				
Pro	Pro	Ser	Gln	Glu	Glu	Met	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Thr	Cys	
		370				375					380					
Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser	
385					390					395					400	
Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Val	Leu	Asp	
				405					410					415		
Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	Leu	Tyr	Ser	Arg	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	
			420					425					430			

Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala
 435 440 445

Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys
 450 455 460

<210> 120

<211> 8

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 120

Arg Phe Arg Asp Asn Thr Pro Asn

1

5

<210> 121

<211> 8

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 121

Arg Phe Arg Asp Asn Thr Ala Asn

1

5

<210> 122

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 122

Ile Thr Phe Glu Phe Val Asp Gln Glu

1

5

<210> 123

<211> 7

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 123

Phe Tyr Glu Thr Pro Leu Gln

1

5

<210> 124

<211> 118

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<221> característica_misc

<222> (1)..(1)

<223> Xaa= qualquer aminoácido

<220>

<221> característica_misc

<222> (3)..(3)

<223> Xaa= qualquer aminoácido

<220>

<221> característica_misc

<222> (5)..(5)

<223> Xaa= qualquer aminoácido

<220>
<221> característica_misc
<222> (7)..(7)
<223> Xaa= qualquer aminoácido
<220>
<221> característica_misc
<222> (9)..(17)
<223> Xaa= qualquer aminoácido
<220>
<221> característica_misc
<222> (19)..(19)
<223> Xaa= qualquer aminoácido
<220>
<221> característica_misc
<222> (21)..(21)
<223> Xaa= qualquer aminoácido
<220>
<221> característica_misc
<222> (23)..(23)
<223> Xaa= qualquer aminoácido
<220>
<221> característica_misc
<222> (25)..(25)
<223> Xaa= qualquer aminoácido
<220>
<221> característica_misc
<222> (39)..(39)
<223> Xaa= qualquer aminoácido
<220>
<221> característica_misc
<222> (41)..(45)
<223> Xaa= qualquer aminoácido
<220>
<221> característica_misc
<222> (47)..(47)
<223> Xaa= qualquer aminoácido
<220>
<221> característica_misc
<222> (60)..(60)
<223> Xaa= qualquer aminoácido
<220>
<221> característica_misc
<222> (62)..(63)
<223> Xaa= qualquer aminoácido
<220>
<221> característica_misc
<222> (65)..(67)
<223> Xaa= qualquer aminoácido
<220>
<221> característica_misc
<222> (69)..(69)
<223> Xaa= qualquer aminoácido

<220>
<221> característica_misc
<222> (71)..(71)
<223> Xaa= qualquer aminoácido
<220>
<221> característica_misc
<222> (73)..(78)
<223> Xaa= qualquer aminoácido
<220>
<221> característica_misc
<222> (80)..(80)
<223> Xaa= qualquer aminoácido
<220>
<221> característica_misc
<222> (82)..(82)
<223> Xaa= qualquer aminoácido
<220>
<221> característica_misc
<222> (84)..(85)
<223> Xaa= qualquer aminoácido
<220>
<221> característica_misc
<222> (87)..(89)
<223> Xaa= qualquer aminoácido
<220>
<221> característica_misc
<222> (91)..(91)
<223> Xaa= qualquer aminoácido
<220>
<221> característica_misc
<222> (93)..(93)
<223> Xaa= qualquer aminoácido
<220>
<221> característica_misc
<222> (110)..(110)
<223> Xaa= qualquer aminoácido
<220>
<221> característica_misc
<222> (113)..(113)
<223> Xaa= qualquer aminoácido
<220>
<221> característica_misc
<222> (115)..(115)
<223> Xaa= qualquer aminoácido
<220>
<221> característica_misc
<222> (117)..(118)
<223> Xaa= qualquer aminoácido
<400> 124

Xaa Val Xaa Leu Xaa Glu Xaa Gly Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 1 5 10 15

Xaa Leu Xaa Leu Xaa Cys Xaa Val Xaa Asp Tyr Ser Ile Thr Ser Asp
 20 25 30

Tyr Ala Trp Asn Trp Ile Xaa Gln Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Leu Xaa Trp
 35 40 45

Met Gly Tyr Ile Ser Tyr Ser Gly Ser Thr Ser Xaa Asn Xaa Xaa Leu
 50 55 60

Xaa Xaa Xaa Ile Xaa Ile Xaa Arg Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Phe Xaa
 65 70 75 80

Leu Xaa Leu Xaa Xaa Val Xaa Xaa Xaa Asp Xaa Ala Xaa Tyr Tyr Cys
 85 90 95

Ala Ser Phe Asp Tyr Ala His Ala Met Asp Tyr Trp Gly Xaa Gly Thr
 100 105 110

Xaa Val Xaa Val Xaa Xaa
 115

<210> 125

<211> 118

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<221> característica_misc

<222> (3)..(3)

<223> Xaa= qualquer aminoácido

<220>

<221> característica_misc

<222> (5)..(5)

<223> Xaa= qualquer aminoácido

<220>

<221> característica_misc

<222> (7)..(7)

<223> Xaa= qualquer aminoácido

<220>

<221> característica_misc

<222> (10)..(11)

<223> Xaa= qualquer aminoácido

<220>

<221> característica_misc

<222> (13)..(13)

<223> Xaa= qualquer aminoácido

<220>
<221> característica_misc
<222> (15)..(17)
<223> Xaa= qualquer aminoácido
<220>
<221> característica_misc
<222> (19)..(19)
<223> Xaa= qualquer aminoácido
<220>
<221> característica_misc
<222> (21)..(21)
<223> Xaa= qualquer aminoácido
<220>
<221> característica_misc
<222> (23)..(23)
<223> Xaa= qualquer aminoácido
<220>
<221> característica_misc
<222> (41)..(41)
<223> Xaa= qualquer aminoácido
<220>
<221> característica_misc
<222> (43)..(44)
<223> Xaa= qualquer aminoácido
<220>
<221> característica_misc
<222> (66)..(66)
<223> Xaa= qualquer aminoácido
<220>
<221> característica_misc
<222> (69)..(69)
<223> Xaa= qualquer aminoácido
<220>
<221> característica_misc
<222> (71)..(71)
<223> Xaa= qualquer aminoácido
<220>
<221> característica_misc
<222> (73)..(73)
<223> Xaa= qualquer aminoácido
<220>
<221> característica_misc
<222> (75)..(76)
<223> Xaa= qualquer aminoácido
<220>
<221> característica_misc
<222> (78)..(78)
<223> Xaa= qualquer aminoácido
<220>
<221> característica_misc
<222> (80)..(80)
<223> Xaa= qualquer aminoácido

```

<220>
<221> característica_misc
<222> (82)..(82)
<223> Xaa= qualquer aminoácido
<220>
<221> característica_misc
<222> (84)..(85)
<223> Xaa= qualquer aminoácido
<220>
<221> característica_misc
<222> (87)..(89)
<223> Xaa= qualquer aminoácido
<220>
<221> característica_misc
<222> (91)..(91)
<223> Xaa= qualquer aminoácido
<220>
<221> característica_misc
<222> (110)..(110)
<223> Xaa= qualquer aminoácido
<220>
<221> característica_misc
<222> (113)..(113)
<223> Xaa= qualquer aminoácido
<220>
<221> característica_misc
<222> (115)..(115)
<223> Xaa= qualquer aminoácido
<220>
<221> característica_misc
<222> (117)..(118)
<223> Xaa= qualquer aminoácido
<400> 125
Asp Val Xaa Leu Xaa Glu Xaa Gly Pro Xaa Xaa Val Xaa Pro Xaa Xaa
1 5 10 15

Xaa Leu Xaa Leu Xaa Cys Xaa Val Thr Asp Tyr Ser Ile Thr Ser Asp
20 25 30

Tyr Ala Trp Asn Trp Ile Arg Gln Xaa Pro Xaa Xaa Lys Leu Glu Trp

```

	35		40		45												
Met	Gly	Tyr	Ile	Ser	Tyr	Ser	Gly	Ser	Thr	Ser	Tyr	Asn	Pro	Ser	Leu		
	50					55					60						
Lys	Xaa	Arg	Ile	Xaa	Ile	Xaa	Arg	Xaa	Thr	Xaa	Xaa	Asn	Xaa	Phe	Xaa		
65					70					75					80		
Leu	Xaa	Leu	Xaa	Xaa	Val	Xaa	Xaa	Xaa	Asp	Xaa	Ala	Thr	Tyr	Tyr	Cys		
				85					90					95			
Ala	Ser	Phe	Asp	Tyr	Ala	His	Ala	Met	Asp	Tyr	Trp	Gly	Xaa	Gly	Thr		
			100					105					110				

Xaa Val Xaa Val Xaa Xaa
115

<210> 126
 <211> 118
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <220>
 <221> característica_misc
 <222> (1)..(1)
 <223> Xaa= qualquer aminoácido
 <220>
 <221> característica_misc
 <222> (17)..(17)
 <223> Xaa= qualquer aminoácido
 <220>
 <221> característica_misc
 <222> (25)..(25)
 <223> Xaa= qualquer aminoácido
 <220>
 <221> característica_misc
 <222> (44)..(45)
 <223> Xaa= qualquer aminoácido
 <220>
 <221> característica_misc
 <222> (69)..(69)
 <223> Xaa= qualquer aminoácido
 <220>
 <221> característica_misc
 <222> (71)..(71)
 <223> Xaa= qualquer aminoácido
 <220>
 <221> característica_misc
 <222> (80)..(80)
 <223> Xaa= qualquer aminoácido

<220>
 <221> característica_misc
 <222> (88)..(89)
 <223> Xaa= qualquer aminoácido
 <220>
 <221> característica_misc
 <222> (93)..(93)
 <223> Xaa= qualquer aminoácido
 <220>
 <221> característica_misc
 <222> (113)..(113)
 <223> Xaa= qualquer aminoácido
 <400> 126
Xaa Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Gln
1 5 10 15

Xaa Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Xaa Asp Tyr Ser Ile Thr Ser Asp
20 25 30

Tyr Ala Trp Asn Trp Ile Arg Gln Phe Pro Gly Xaa Xaa Leu Glu Trp
35 40 45

Met Gly Tyr Ile Ser Tyr Ser Gly Ser Thr Ser Tyr Asn Pro Ser Leu
50 55 60

Lys Ser Arg Ile Xaa Ile Xaa Arg Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Xaa
65 70 75 80

Leu Gln Leu Asn Ser Val Thr Xaa Xaa Asp Thr Ala Xaa Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Ser Phe Asp Tyr Ala His Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110

Xaa Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 127
 <211> 118
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <220>
 <221> característica_misc
 <222> (17)..(17)
 <223> Xaa= qualquer aminoácido
 <220>
 <221> característica_misc
 <222> (44)..(44)

<223> Xaa= qualquer aminoácido
 <220>
 <221> característica_misc
 <222> (69)..(69)
 <223> Xaa= qualquer aminoácido
 <220>
 <221> característica_misc
 <222> (71)..(71)
 <223> Xaa= qualquer aminoácido
 <220>
 <221> característica_misc
 <222> (80) ..(80)
 <223> Xaa= qualquer aminoácido
 <220>
 <221> característica_misc
 <222> (88)..(89)
 <223> Xaa= qualquer aminoácido
 <220>
 <221> característica_misc
 <222> (113)..(113)
 <223> Xaa= qualquer aminoácido
 <400> 127

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

Xaa Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Thr Asp Tyr Ser Ile Thr Ser Asp
 20 25 30

Tyr Ala Trp Asn Trp Ile Arg Gln Phe Pro Gly Xaa Lys Leu Glu Trp
 35 40 45

Met Gly Tyr Ile Ser Tyr Ser Gly Ser Thr Ser Tyr Asn Pro Ser Leu
 50 55 60

Lys Ser Arg Ile Xaa Ile Xaa Arg Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Xaa
 65 70 75 80

Leu Gln Leu Asn Ser Val Thr Xaa Xaa Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys
 85 90 95

Ala Ser Phe Asp Tyr Ala His Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
 100 105 110

Xaa Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 128

<211> 109

<212> PRT
<213> Homo sapiens
<220>
<221> característica_misc
<222> (1)..(1)
<223> Xaa= qualquer aminoácido
<220>
<221> característica_misc
<222> (3)..(3)
<223> Xaa= qualquer aminoácido
<220>
<221> característica_misc
<222> (5)..(5)
<223> Xaa= qualquer aminoácido
<220>
<221> característica_misc
<222> (7)..(12)
<223> Xaa= qualquer aminoácido
<220>
<221> característica_misc
<222> (14)..(18)
<223> Xaa= qualquer aminoácido
<220>
<221> característica_misc
<222> (20)..(20)
<223> Xaa= qualquer aminoácido
<220>
<221> característica_misc
<222> (22)..(22)
<223> Xaa= qualquer aminoácido
<220>
<221> característica_misc
<222> (24)..(24)
<223> Xaa= qualquer aminoácido
<220>
<221> característica_misc
<222> (26)..(26)
<223> Xaa= qualquer aminoácido
<220>
<221> característica_misc
<222> (37)..(37)
<223> Xaa= qualquer aminoácido
<220>
<221> característica_misc
<222> (39)..(43)
<223> Xaa= qualquer aminoácido
<220>
<221> característica_misc
<222> (45)..(45)
<223> Xaa= qualquer aminoácido
<220>
<221> característica_misc

<222> (54)..(57)
<223> Xaa= qualquer aminoácido
<220>
<221> característica_misc
<222> (59)..(61)
<223> Xaa= qualquer aminoácido
<220>
<221> característica_misc
<222> (63)..(63)
<223> Xaa= qualquer aminoácido
<220>
<221> característica_misc
<222> (65)..(65)
<223> Xaa= qualquer aminoácido
<220>
<221> característica_misc
<222> (67)..(67)
<223> Xaa= qualquer aminoácido
<220>
<221> característica_misc
<222> (69)..(70)
<223> Xaa= qualquer aminoácido
<220>
<221> característica_misc
<222> (72)..(72)
<223> Xaa= qualquer aminoácido
<220>
<221> característica_misc
<222> (74)..(74)
<223> Xaa= qualquer aminoácido
<220>
<221> característica_misc
<222> (76)..(77)
<223> Xaa= qualquer aminoácido
<220>
<221> característica_misc
<222> (79)..(81)
<223> Xaa= qualquer aminoácido
<220>
<221> característica_misc
<222> (83)..(83)
<223> Xaa= qualquer aminoácido
<220>
<221> característica_misc
<222> (100)..(100)
<223> Xaa= qualquer aminoácido
<220>
<221> característica_misc
<222> (103)..(103)
<223> Xaa= qualquer aminoácido
<220>
<221> característica_misc

<222> (105)..(109)

<223> Xaa= qualquer aminoácido

<400> 128

Xaa Ile Xaa Leu Xaa Gln Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Val Xaa Xaa Xaa
1 5 10 15

Xaa Xaa Val Xaa Phe Xaa Cys Xaa Ala Xaa Gln Ser Ile Gly Thr Ser
20 25 30

Ile His Trp Tyr Xaa Gln Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Pro Xaa Leu Leu Ile
35 40 45

Lys Tyr Ala Ser Glu Xaa Xaa Xaa Xaa Ile Xaa Xaa Xaa Phe Xaa Gly
50 55 60

Xaa Gly Xaa Gly Xaa Xaa Phe Xaa Leu Xaa Ile Xaa Xaa Val Xaa Xaa
65 70 75 80

Xaa Asp Xaa Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Gln Ile Asn Ser Trp Pro Thr
85 90 95

Thr Phe Gly Xaa Gly Thr Xaa Leu Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
100 105

<210> 129

<211> 109

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<221> característica_misc

<222> (1)..(1)

<223> Xaa= qualquer aminoácido

<220>

<221> característica_misc

<222> (3)..(3)

<223> Xaa= qualquer aminoácido

<220>

<221> característica_misc

<222> (5)..(5)

<223> Xaa= qualquer aminoácido

<220>

<221> característica_misc

<222> (7)..(7)

<223> Xaa= qualquer aminoácido

<220>

<221> característica_misc

<222> (9)..(10)

<223> Xaa= qualquer aminoácido

<220>

<221> característica_misc
<222> (12)..(12)
<223> Xaa= qualquer aminoácido
<220>
<221> característica_misc
<222> (14)..(14)
<223> Xaa= qualquer aminoácido
<220>
<221> característica_misc
<222> (16)..(18)
<223> Xaa= qualquer aminoácido
<220>
<221> característica_misc
<222> (20)..(20)
<223> Xaa= qualquer aminoácido
<220>
<221> característica_misc
<222> (22)..(22)
<223> Xaa= qualquer aminoácido
<220>
<221> característica_misc
<222> (24)..(24)
<223> Xaa= qualquer aminoácido
<220>
<221> característica_misc
<222> (39)..(39)
<223> Xaa= qualquer aminoácido
<220>
<221> característica_misc
<222> (41)..(42)
<223> Xaa= qualquer aminoácido
<220>
<221> característica_misc
<222> (54)..(54)
<223> Xaa= qualquer aminoácido
<220>
<221> característica_misc
<222> (57)..(57)
<223> Xaa= qualquer aminoácido
<220>
<221> característica_misc
<222> (60)..(60)
<223> Xaa= qualquer aminoácido
<220>
<221> característica_misc
<222> (63)..(63)
<223> Xaa= qualquer aminoácido
<220>
<221> característica_misc
<222> (65)..(65)
<223> Xaa= qualquer aminoácido
<220>

```

<221> característica_misc
<222> (67)..(67)
<223> Xaa= qualquer aminoácido
<220>
<221> característica_misc
<222> (69)..(70)
<223> Xaa= qualquer aminoácido
<220>
<221> característica_misc
<222> (72)..(72)
<223> Xaa= qualquer aminoácido
<220>
<221> característica_misc
<222> (74)..(74)
<223> Xaa= qualquer aminoácido
<220>
<221> característica_misc
<222> (76)..(77)
<223> Xaa= qualquer aminoácido
<220>
<221> característica_misc
<222> (79)..(81)
<223> Xaa= qualquer aminoácido
<220>
<221> característica_misc
<222> (83)..(83)
<223> Xaa= qualquer aminoácido
<220>
<221> característica_misc
<222> (100)..(100)
<223> Xaa= qualquer aminoácido
<220>
<221> característica_misc
<222> (103)..(103)
<223> Xaa= qualquer aminoácido
<220>
<221> característica_misc
<222> (105)..(109)
<223> Xaa= qualquer aminoácido
<400> 129

```

```

Xaa Ile Xaa Leu Xaa Gln Xaa Pro Xaa Xaa Leu Xaa Val Xaa Pro Xaa
1                5                10                15

```

Xaa Xaa Val Xaa Phe Xaa Cys Xaa Ala Ser Gln Ser Ile Gly Thr Ser
 20 25 30

Ile His Trp Tyr Gln Gln Xaa Thr Xaa Xaa Ser Pro Arg Leu Leu Ile
 35 40 45

Lys Tyr Ala Ser Glu Xaa Ile Ser Xaa Ile Pro Xaa Arg Phe Xaa Gly
 50 55 60

Xaa Gly Xaa Gly Xaa Xaa Phe Xaa Leu Xaa Ile Xaa Xaa Val Xaa Xaa
 65 70 75 80

Xaa Asp Xaa Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Gln Ile Asn Ser Trp Pro Thr
 85 90 95

Thr Phe Gly Xaa Gly Thr Xaa Leu Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 100 105

<210> 130

<211> 109

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<221> característica_misc

<222> (1)..(1)

<223> Xaa= qualquer aminoácido

<220>

<221> característica_misc

<222> (3)..(3)

<223> Xaa= qualquer aminoácido

<220>

<221> característica_misc

<222> (9)..(10)

<223> Xaa= qualquer aminoácido

<220>

<221> característica_misc

<222> (20)..(20)

<223> Xaa= qualquer aminoácido

<220>

<221> característica_misc

<222> (39)..(39)

<223> Xaa= qualquer aminoácido

<220>

<221> característica_misc

<222> (41)..(43)

<223> Xaa= qualquer aminoácido

<220>

<221> característica_misc

<222> (54)..(56)

<223> Xaa= qualquer aminoácido
 <220>
 <221> característica_misc
 <222> (60)..(60)
 <223> Xaa= qualquer aminoácido
 <220>
 <221> característica_misc
 <222> (74)..(74)
 <223> Xaa= qualquer aminoácido
 <220>
 <221> característica_misc
 <222> (76)..(77)
 <223> Xaa= qualquer aminoácido
 <220>
 <221> característica_misc
 <222> (83)..(83)
 <223> Xaa= qualquer aminoácido
 <220>
 <221> característica_misc
 <222> (100)..(100)
 <223> Xaa= qualquer aminoácido
 <220>
 <221> característica_misc
 <222> (109)..(109)
 <223> Xaa= qualquer aminoácido
 <400> 130

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

Glu Arg Val Xaa Phe Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Gly Thr Ser
 20 25 30

Ile His Trp Tyr Gln Gln Xaa Thr Xaa Xaa Xaa Pro Arg Leu Leu Ile
 35 40 45

Lys Tyr Ala Ser Glu Xaa Xaa Xaa Gly Ile Pro Xaa Arg Phe Ser Gly
 50 55 60

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

Glu Asp Xaa Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Gln Ile Asn Ser Trp Pro Thr
 85 90 95

Thr Phe Gly Xaa Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Xaa
 100 105

<210> 131

<211> 109

<212> PRT
<213> Homo sapiens
<220>
<221> característica_misc
<222> (1)..(1)
<223> Xaa= qualquer aminoácido
<220>
<221> característica_misc
<222> (3)..(3)
<223> Xaa= qualquer aminoácido
<220>
<221> característica_misc
<222> (9)..(10)
<223> Xaa= qualquer aminoácido
<220>
<221> característica_misc
<222> (20)..(20)
<223> Xaa= qualquer aminoácido
<220>
<221> característica_misc
<222> (39)..(39)
<223> Xaa= qualquer aminoácido
<220>
<221> característica_misc
<222> (41)..(42)
<223> Xaa= qualquer aminoácido
<220>
<221> característica_misc
<222> (54)..(54)
<223> Xaa= qualquer aminoácido
<220>
<221> característica_misc
<222> (60)..(60)
<223> Xaa= qualquer aminoácido
<220>
<221> característica_misc
<222> (74)..(74)
<223> Xaa= qualquer aminoácido
<220>
<221> característica_misc
<222> (76)..(77)
<223> Xaa= qualquer aminoácido
<220>
<221> característica_misc
<222> (83)..(83)
<223> Xaa= qualquer aminoácido
<220>
<221> característica_misc
<222> (100)..(100)
<223> Xaa= qualquer aminoácido
<220>
<221> característica_misc

<222> (109)..(109)

<223> Xaa= qualquer aminoácido

<400> 131

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

Glu Arg Val Xaa Phe Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Gly Thr Ser
20 25 30

Ile His Trp Tyr Gln Gln Xaa Thr Xaa Xaa Ser Pro Arg Leu Leu Ile
35 40 45

Lys Tyr Ala Ser Glu Xaa Ile Ser Gly Ile Pro Xaa Arg Phe Ser Gly
50 55 60

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

Glu Asp Xaa Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Gln Ile Asn Ser Trp Pro Thr
85 90 95

Thr Phe Gly Xaa Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Xaa
100 105

<210> 132

<211> 109

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<221> característica_misc

<222> (1)..(1)

<223> Xaa= qualquer aminoácido

<220>

<221> característica_misc

<222> (3)..(3)

<223> Xaa= qualquer aminoácido

<220>

<221> característica_misc

<222> (9)..(10)

<223> Xaa= qualquer aminoácido

<220>

<221> característica_misc

<222> (20)..(20)

<223> Xaa= qualquer aminoácido

<220>

<221> característica_misc

<222> (39)..(39)

<223> Xaa= qualquer aminoácido

<220>

<221> característica_misc
 <222> (41)..(43)
 <223> Xaa= qualquer aminoácido
 <220>
 <221> característica_misc
 <222> (60)..(60)
 <223> Xaa= qualquer aminoácido
 <220>
 <221> característica_misc
 <222> (74)..(74)
 <223> Xaa= qualquer aminoácido
 <220>
 <221> característica_misc
 <222> (76)..(77)
 <223> Xaa= qualquer aminoácido
 <220>
 <221> característica_misc
 <222> (83)..(83)
 <223> Xaa= qualquer aminoácido
 <220>
 <221> característica_misc
 <222> (100)..(100)
 <223> Xaa= qualquer aminoácido
 <220>
 <221> característica_misc
 <222> (109)..(109)
 <223> Xaa= qualquer aminoácido
 <400> 132

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

Glu Arg Val Xaa Phe Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Gly Thr Ser
 20 25 30

Ile His Trp Tyr Gln Gln Xaa Thr Xaa Xaa Xaa Pro Arg Leu Leu Ile
 35 40 45

Lys Tyr Ala Ser Glu Ser Ile Ser Gly Ile Pro Xaa Arg Phe Ser Gly
 50 55 60

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

Glu Asp Xaa Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Gln Ile Asn Ser Trp Pro Thr

85

90

95

Thr Phe Gly Xaa Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Xaa
 100 105

<210> 133
 <211> 118
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <220>
 <221> característica_misc
 <222> (1)..(1)
 <223> Xaa= qualquer aminoácido
 <220>
 <221> característica_misc
 <222> (3)..(3)
 <223> Xaa= qualquer aminoácido
 <220>
 <221> característica_misc
 <222> (5)..(5)
 <223> Xaa= qualquer aminoácido
 <220>
 <221> característica_misc
 <222> (7)..(7)
 <223> Xaa= qualquer aminoácido
 <220>
 <221> característica_misc
 <222> (9)..(17)
 <223> Xaa= qualquer aminoácido
 <220>
 <221> característica_misc
 <222> (19)..(19)
 <223> Xaa= qualquer aminoácido
 <220>
 <221> característica_misc
 <222> (21)..(21)
 <223> Xaa= qualquer aminoácido
 <220>
 <221> característica_misc
 <222> (23)..(23)
 <223> Xaa= qualquer aminoácido
 <220>
 <221> característica_misc
 <222> (25)..(25)
 <223> Xaa= qualquer aminoácido
 <220>
 <221> característica_misc
 <222> (39)..(39)
 <223> Xaa= qualquer aminoácido
 <220>
 <221> característica_misc
 <222> (41)..(45)

<223> Xaa= qualquer aminoácido
<220>
<221> característica_misc
<222> (47)..(47)
<223> Xaa= qualquer aminoácido
<220>
<221> característica_misc
<222> (60)..(60)
<223> Xaa= qualquer aminoácido
<220>
<221> característica_misc
<222> (62)..(63)
<223> Xaa= qualquer aminoácido
<220>
<221> característica_misc
<222> (65)..(67)
<223> Xaa= qualquer aminoácido
<220>
<221> característica_misc
<222> (69)..(69)
<223> Xaa= qualquer aminoácido
<220>
<221> característica_misc
<222> (71)..(71)
<223> Xaa= qualquer aminoácido
<220>
<221> característica_misc
<222> (73)..(78)
<223> Xaa= qualquer aminoácido
<220>
<221> característica_misc
<222> (80)..(80)
<223> Xaa= qualquer aminoácido
<220>
<221> característica_misc
<222> (82)..(82)
<223> Xaa= qualquer aminoácido
<220>
<221> característica_misc
<222> (84)..(85)
<223> Xaa= qualquer aminoácido
<220>
<221> característica_misc
<222> (87)..(89)
<223> Xaa= qualquer aminoácido
<220>
<221> característica_misc
<222> (91)..(91)
<223> Xaa= qualquer aminoácido
<220>
<221> característica_misc
<222> (93)..(93)

<223> Xaa= qualquer aminoácido

<220>

<221> característica_misc

<222> (110)..(110)

<223> Xaa= qualquer aminoácido

<220>

<221> característica_misc

<222> (113)..(113)

<223> Xaa= qualquer aminoácido

<220>

<221> característica_misc

<222> (115)..(115)

<223> Xaa= qualquer aminoácido

<220>

<221> característica_misc

<222> (117)..(118)

<223> Xaa= qualquer aminoácido

<400> 133

Xaa Val Xaa Leu Xaa Glu Xaa Gly Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
1 5 10 15

Xaa Leu Xaa Leu Xaa Cys Xaa Val Xaa Asp Tyr Ser Ile Thr Ser Asp
20 25 30

Tyr Ala Trp Asn Trp Ile Xaa Gln Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Leu Xaa Trp
35 40 45

Met Gly Tyr Ile Ser Tyr Ser Gly Ser Thr Ser Xaa Asn Xaa Xaa Leu
50 55 60

Xaa Xaa Xaa Ile Xaa Ile Xaa Arg Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Phe Xaa
65 70 75 80

Leu Xaa Leu Xaa Xaa Val Xaa Xaa Xaa Asp Xaa Ala Xaa Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Ser Phe Asp Tyr Ala His Ala Met Asp Tyr Trp Gly Xaa Gly Thr
100 105 110

Xaa Val Xaa Val Xaa Xaa
115

<210> 134

<211> 109

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<221> característica_misc

<222> (1)..(1)
<223> Xaa= qualquer aminoácido
<220>
<221> característica_misc
<222> (3)..(3)
<223> Xaa= qualquer aminoácido
<220>
<221> característica_misc
<222> (5)..(5)
<223> Xaa= qualquer aminoácido
<220>
<221> característica_misc
<222> (7)..(12)
<223> Xaa= qualquer aminoácido
<220>
<221> característica_misc
<222> (14)..(18)
<223> Xaa= qualquer aminoácido
<220>
<221> característica_misc
<222> (20)..(20)
<223> Xaa= qualquer aminoácido
<220>
<221> característica_misc
<222> (22)..(22)
<223> Xaa= qualquer aminoácido
<220>
<221> característica_misc
<222> (24)..(24)
<223> Xaa= qualquer aminoácido
<220>
<221> característica_misc
<222> (26)..(26)
<223> Xaa= qualquer aminoácido
<220>
<221> característica_misc
<222> (37)..(37)
<223> Xaa= qualquer aminoácido
<220>
<221> característica_misc
<222> (39)..(43)
<223> Xaa= qualquer aminoácido
<220>
<221> característica_misc
<222> (45)..(45)
<223> Xaa= qualquer aminoácido
<220>
<221> característica_misc
<222> (54)..(57)
<223> Xaa= qualquer aminoácido
<220>
<221> característica_misc

<222> (59)..(61)
<223> Xaa= qualquer aminoácido
<220>
<221> característica_misc
<222> (63)..(63)
<223> Xaa= qualquer aminoácido
<220>
<221> característica_misc
<222> (65)..(65)
<223> Xaa= qualquer aminoácido
<220>
<221> característica_misc
<222> (67)..(67)
<223> Xaa= qualquer aminoácido
<220>
<221> característica_misc
<222> (69)..(70)
<223> Xaa= qualquer aminoácido
<220>
<221> característica_misc
<222> (72)..(72)
<223> Xaa= qualquer aminoácido
<220>
<221> característica_misc
<222> (74)..(74)
<223> Xaa= qualquer aminoácido
<220>
<221> característica_misc
<222> (76)..(77)
<223> Xaa= qualquer aminoácido
<220>
<221> característica_misc
<222> (79)..(81)
<223> Xaa= qualquer aminoácido
<220>
<221> característica_misc
<222> (83)..(83)
<223> Xaa= qualquer aminoácido
<220>
<221> característica_misc
<222> (100)..(100)
<223> Xaa= qualquer aminoácido
<220>
<221> característica_misc
<222> (103)..(103)
<223> Xaa= qualquer aminoácido
<220>
<221> característica_misc
<222> (105)..(109)
<223> Xaa= qualquer aminoácido
<400> 134

Xaa Ile Xaa Leu Xaa Gln Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Val Xaa Xaa Xaa
 1 5 10 15

Xaa Xaa Val Xaa Phe Xaa Cys Xaa Ala Xaa Gln Ser Ile Gly Thr Ser
 20 25 30

Ile His Trp Tyr Xaa Gln Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Pro Xaa Leu Leu Ile
 35 40 45

Lys Tyr Ala Ser Glu Xaa Xaa Xaa Xaa Ile Xaa Xaa Xaa Phe Xaa Gly
 50 55 60

Xaa Gly Xaa Gly Xaa Xaa Phe Xaa Leu Xaa Ile Xaa Xaa Val Xaa Xaa
 65 70 75 80

Xaa Asp Xaa Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Gln Ile Asn Ser Trp Pro Thr
 85 90 95

Thr Phe Gly Xaa Gly Thr Xaa Leu Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 100 105

<210> 135

<211> 327

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 135

gaaatagtcc ttaccaatc tcccggaacc ctctcagtat ctcccggcga acgagtaacc 60

ttttcatgta gagcatccca atccatcggc acttcaattc actggtatca gcagaaaaca 120

ggccaatccc cacggcttct tataaaatat gcatcagaat caatttctgg catcccagac 180

agattttcag gttcaggatc aggcaccgat ttcacactta caatatccag agtcgaatca 240

gaagattttg cagattacta ttgtcaacaa ataaacagct ggcccactac attcggacaa 300

ggcacaaaac tcgaaattaa acgtacg 327

<210> 136

<211> 109

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 136

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

Glu Arg Val Thr Phe Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Gly Thr Ser
 20 25 30

Ile His Trp Tyr Gln Gln Lys Thr Gly Gln Ser Pro Arg Leu Leu Ile
 35 40 45

Lys Tyr Ala Ser Glu Ser Ile Ser Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser Gly
 50 55 60

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

Glu Asp Phe Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Gln Ile Asn Ser Trp Pro Thr
 85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Thr
 100 105

<210> 137

<211> 327

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 137

gaaatagttc ttactcaatc ccccgggtaca ctctcagttt ccccaggcga acgcgtcact 60
 ttttcttgca gagcatcaca atcaatcggc acttcaattc attggtatca acaaaaaaca 120
 ggacaggccc cacgacttct tattaaatat gcatcagaat caatttctgg catcccagac 180
 agattttcag gttcaggatc aggcaccgat ttcacactta caatatccag agtcgaatca 240
 gaagattttg cagattacta ttgtcaacaa ataaacagct ggcccactac attcggacaa 300
 ggcacaaaac tcgaaattaa acgtacg 327

Lisboa, 17 de Julho de 2015

REIVINDICAÇÕES

1. Anticorpo anti-M-CSF humanizado, caracterizado por:
 - (i) a cadeia pesada compreender a sequência da região variável da cadeia pesada mostrada na SEQ ID NO: 43 e uma região constante IgG1; e
 - (ii) a cadeia leve compreender a sequência da região variável da cadeia leve mostrada na SEQ ID NO: 53.
2. Anticorpo de acordo com reivindicação 1 caracterizado por compreender a sequência de cadeia pesada mostrada na SEQ ID NO: 116.
3. Anticorpo de acordo com a reivindicação 1 ou reivindicação 2, caracterizado por a cadeia leve compreender uma região constante kappa humana.
4. Composição farmacêutica caracterizada por compreender um anticorpo tal como definido em qualquer uma das reivindicações 1-3, e um transportador, excipiente ou diluente farmacêuticamente aceitável.
5. Anticorpo tal como definido em qualquer uma das reivindicações 1-3, para uso em aplicações terapêuticas que envolvam a administração *in vivo* a um humano.
6. Anticorpo tal como definido em qualquer uma das reivindicações 1-3 para uso na prevenção ou tratamento de um indivíduo que sofre de uma doença que causa ou

contribui para a osteólise, em que o referido anticorpo reduz eficazmente a severidade da perda óssea associada à doença.

7. Anticorpo para uso de acordo com a reivindicação 6 caracterizado por a referida doença ser selecionada de entre o grupo que consiste em doenças as metabólicas dos ossos associadas a atividade de osteoclastos relativamente aumentada, incluindo endocrinopatias (incluindo hipercortisolismo, hipogonadismo, hiperparatiroidismo primário ou secundário, hipertiroidismo), hipercalcemia, estados de deficiência (raquitismo/osteomalacia, escorbuto, malnutrição), doenças crónicas (incluindo síndromes de má absorção, falência renal crónica (incluindo osteodistrofia renal), doença hepática crónica (incluindo osteodistrofia hepática), fármacos (incluindo glucocorticoides (osteoporose induzida por glucocorticoides), heparina, álcool), e doenças hereditárias (incluindo osteogénese imperfeita, homocistinúria), cancro, osteoporose, osteopetrose, inflamação do osso associada a artrite e artrite reumatóide, doença periodontal, displasia fibrosa, e/ou doença de Paget.
8. Anticorpo tal como definido em qualquer uma das reivindicações 1-3 para uso na prevenção ou tratamento do cancro metastático no osso caracterizado por o cancro metastático ser da mama, do pulmão, renal, mieloma múltiplo, da tiroide, da próstata, adenocarcinoma, malignidades das células sanguíneas, incluindo leucemia e linfoma; cancros da cabeça e pescoço; cancros gastrointestinais, incluindo cancro esofágico, cancro do estômago, cancro do cólon, cancro intestinal, cancro colo-retal, cancro retal, cancro do

pâncreas, cancro do fígado, cancro do ducto biliar ou da vesícula biliar; malignidades do trato genital feminino, incluindo carcinoma do ovário, cancros endometriais uterinos, cancro vaginal, e cancro cervical; cancro da bexiga; cancro do cérebro, incluindo neuroblastoma; sarcoma, osteossarcoma; e cancro da pele, incluindo melanoma maligno ou cancro das células escamosas.

9. Uso do anticorpo tal como definido em qualquer uma das reivindicações 1-3 no fabrico de um medicamento para a prevenção ou tratamento da perda óssea em doentes exibindo osteólise.
10. Uso do anticorpo tal como definido em qualquer uma das reivindicações 1-3 no fabrico de um medicamento para tratar um doente que sofre de uma doença que causa ou contribui para a osteólise.
11. Uso da reivindicação 10 caracterizado por a referida doença ser selecionada de entre o grupo que consiste em doenças as metabólicas dos ossos associadas a atividade de osteoclastos relativamente aumentada, incluindo endocrinopatias (incluindo hipercortisolismo, hipogonadismo, hiperparatireoidismo primário ou secundário, hipertireoidismo), hipercalcemia, estados de deficiência (raquitismo/osteomalacia, escorbuto, malnutrição), doenças crónicas (incluindo síndromes de má absorção, falência renal crónica (incluindo osteodistrofia renal), doença hepática crónica (incluindo osteodistrofia hepática), fármacos (incluindo glucocorticoides (osteoporose induzida por glucocorticoides), heparina, álcool), e doenças hereditárias (incluindo osteogénese imperfeita,

homocistinúria), cancro, osteoporose, osteopetrose, inflamação do osso associada a artrite e artrite reumatóide, doença periodontal, displasia fibrosa, e/ou doença de Paget.

- 12.** Uso do anticorpo tal como definido em qualquer uma das reivindicações 1-3 no fabrico de um medicamento para a prevenção ou tratamento do cancro metastático no osso num doente sofrendo de cancro metastático.
- 13.** Uso da reivindicação 12 caracterizado por o cancro metastático ser da mama, do pulmão, renal, mieloma múltiplo, da tiroide, da próstata, adenocarcinoma, malignidades das células sanguíneas, incluindo leucemia e linfoma; cancros da cabeça e pescoço; cancros gastrointestinais, incluindo cancro esofágico, cancro do estômago, cancro do cólon, cancro intestinal, cancro colo-retal, cancro retal, cancro do pâncreas, cancro do fígado, cancro do ducto biliar ou da vesícula biliar; malignidades do trato genital feminino, incluindo carcinoma do ovário, cancros endometriais uterinos, cancro vaginal, e cancro cervical; cancro da bexiga; cancro do cérebro, incluindo neuroblastoma; sarcoma, osteossarcoma; e cancro da pele, incluindo melanoma maligno ou cancro das células escamosas.
- 14.** Uso do anticorpo tal como definido em qualquer uma das reivindicações 1-3 no fabrico de um medicamento para tratar um doente com cancro.
- 15.** Uso de qualquer uma das reivindicações 9-14, caracterizado pela quantidade de anticorpo no medicamento ser eficaz para inibir a proliferação e/ou

diferenciação de osteoclastos induzida por células tumorais.

- 16.** Uso de qualquer uma das reivindicações 9-14, caracterizado por a quantidade de anticorpo no medicamento estar numa dosagem eficaz para reduzir a dosagem do segundo agente terapêutico necessário para conseguir um efeito terapêutico.
- 17.** Uso de qualquer uma das reivindicações 9-14, caracterizado por a quantidade de anticorpo no medicamento estar numa dosagem entre cerca de 2 µg/kg a 30 mg/kg de peso corporal.
- 18.** Uso da reivindicação 17 caracterizado por a quantidade de anticorpo no medicamento estar numa dosagem entre cerca de 0,1 mg/kg a 30 mg/kg de peso corporal, ou a quantidade de anticorpo no medicamento estar numa dosagem entre cerca de 0,1 mg/kg a 10 mg/kg de peso corporal.

Lisboa, 17 de julho de 2015

FIG. 1

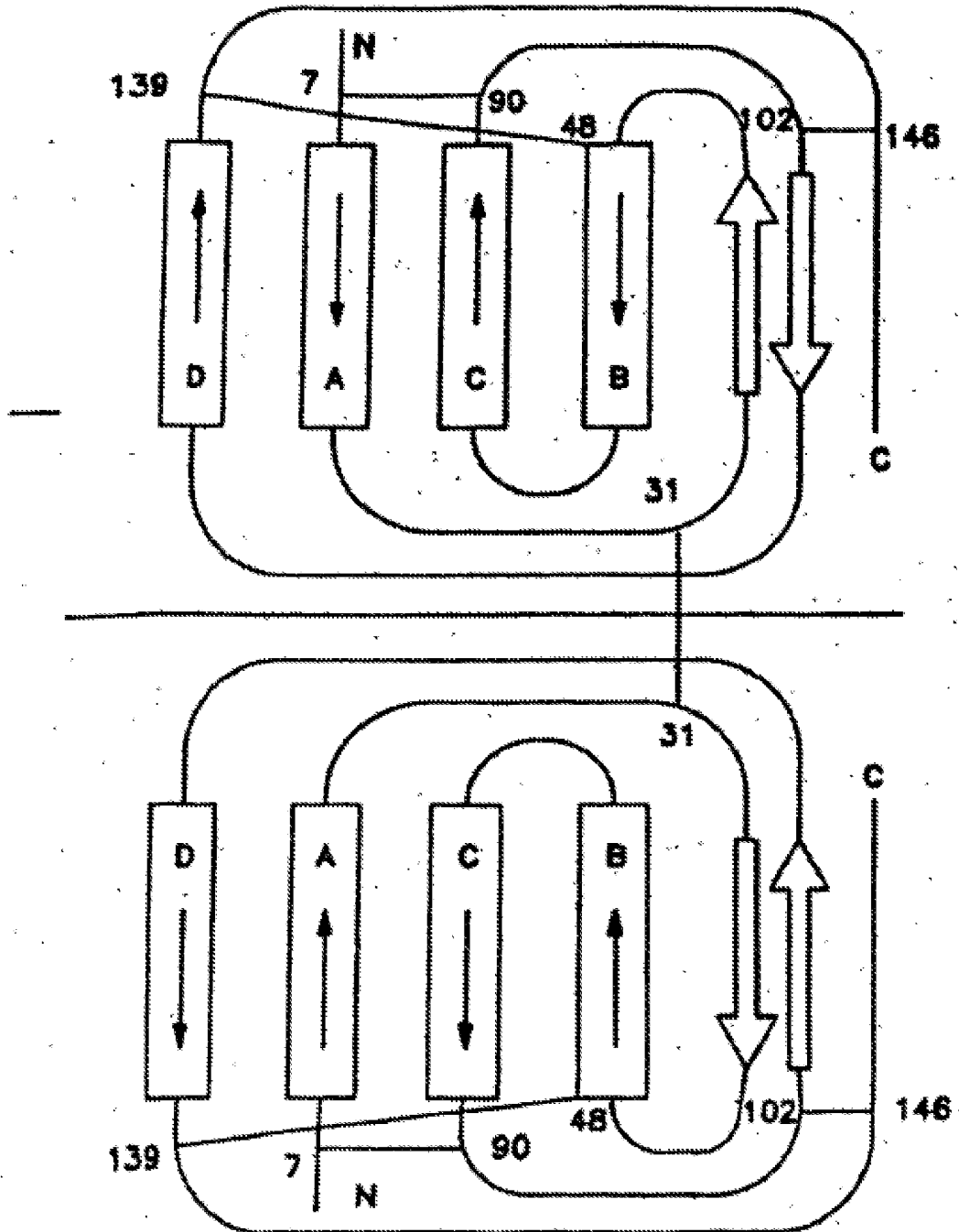
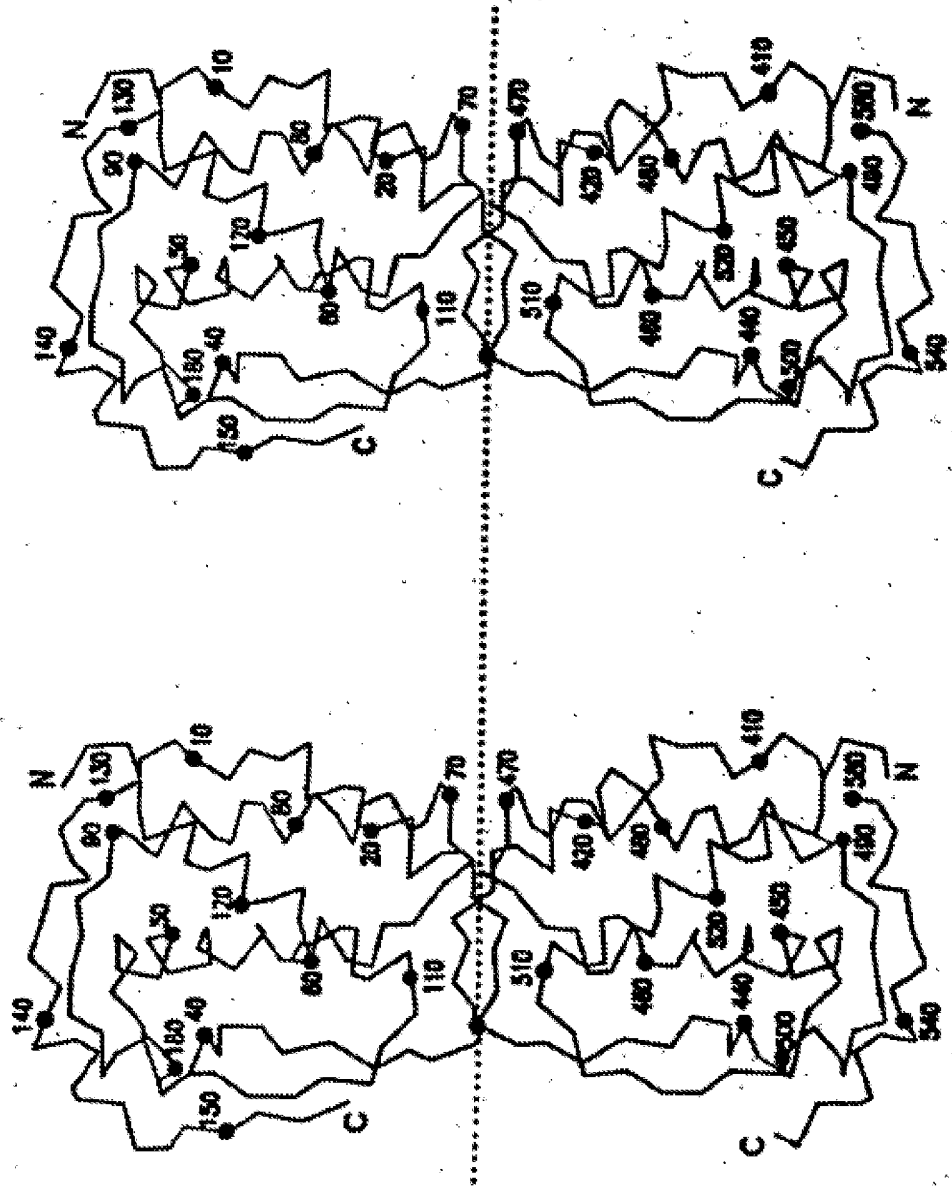


FIG. 2



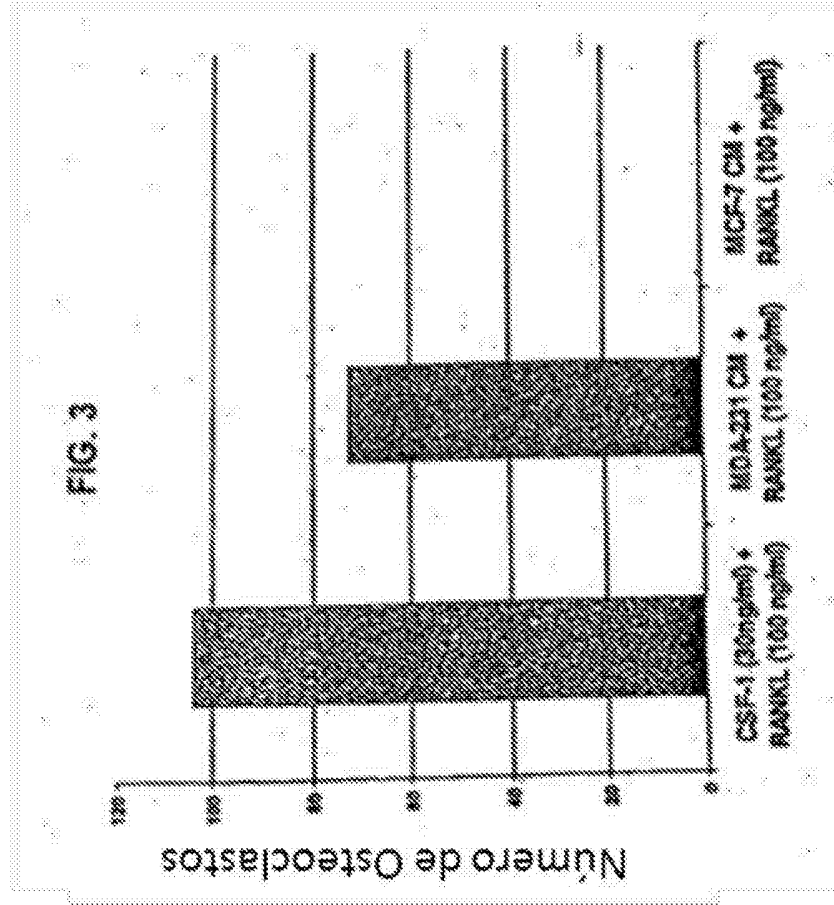


Fig. 4A

Sequência de aminoácidos da cadeia leve de RX1

1
 DILLTQSPAIIISVSPGRVSTFSCAASQISQIETIRHWYQRTWQSPRLIKYANSSISIIIPSRFSSQSGDTFTLISINVSSEDIADYYCOINHWPTTFQDITLKLIRADAAAPTUSIFPPSPSE
 2
 QLTSSQSNVCLANFPEKDIIVKAKIDSSERQGVLSWNTDQSDKSTYSMSSTLILNDEIETSNHSITCEATWKTSTSTPIVKSFRNREK

Sequência de aminoácidos da cadeia pesada de RX1

3
 DVQLQSPGIVKPKFSQSLICTVTDYISITSDYANMHIKQFPQKLEHWYIISYSGSTSNPSELRRIQITRDTFSINQFFLQASVVTEDTATYYCASFDYANMDEYKQDQTSVTVSSAKTIDQ
 4
 ISVYPLAPVCDTTSVTLQCLVWYFPEPTLIRMSQSLSSGHTFPAVLQSLFTLSSQVTTSTSTWPSQDITCRVANPFASTSTVVDKKEIPEKPTTIKPCFPCPCFAPAPMLLQGPSVFIPIRQ
 5
 KIKQVMIISLAPIVTCVYVDSQDFQVQISMPYVWVETACTQINREDYINSLRIVSALFIQDQMSGQKPKCKVMKDLPAPIERTIISPKQSVRAQVYVYLPFPESEETKQVTLTQK
 6
 VTDFPEDIYVWTVNWKTELNYRHTPEVLDSDQSYTMSIKLVEKXINWERNYSICSVVHRELNNHHTIKSFRITPQ

Sequência de nucleótidos da cadeia leve de RX1

atgggtggctgatacatcatctctctggfsgccactgcccacaggtgtgcaactccagcgtccagactccagggtccaggaccctggccctcgtgaaacctctctcaggtctctgcccctcaacctgct
 actgtactgactactccatccaccgtgatacggcctggaactggatccgggaataaacttggatgggtgggtgggtacataagctacagtgatagcacttctacaaatccatct
 ctcaaaagtccgatctccactcctgagacactccagaaacagttctctcctggctggactgtgactactgggacacagcccaataatactgtgcatctctgactatgcccacagcc
 atggataactggggccaaagggacttcgggtcactgtctcttcggccaaaacacaaagcccaatgggtctatccactggccctgtgtgtggagatcaaaactggctcctcgggtgactctaggatgc
 etggtaagggatatactcctgagccctgacttgaacttggactcctgtcctcagtggtgtgcacaccttccagccttccagctctggactctacacctcagcagctcagtg
 actgtactcaggaactggcccagcagtcacactcaactgcaatgtggcccccggcaagcgcacaaagtgaaagaaataaggccccaggggcccacaatcaagccctgtcctca
 tgcataatgcccagcaactaaactcttgggtggaccactccgtctctcatctcctccaaagatcaaggatgtactcatgtcctcctggcccactagtcaaatgtgtggtagatgagc
 gaggatgacccagatgtccagatcagctggtttctgtgaaacaactgggaagtacacccagctcagacacacccctagagggatcacaaagctactctcgggtgggtcagtgccctcccctac
 cagcacaggactggatgagtgccaaaggttcaaatgcaaggtcaacaacaaagactccagcggccatcagaggaaccatctcaaaaccccaaggggtcagtagaggtccacaggtatac
 gctctgctccaccagaaagagatgactaaagaaacaggtcactctgacctgactgaccagacttcatgctgagacacattacagctggagtgagaccacaacagggaaacacagaggtataac
 tacaaagacactgaaaccagctcctggactcgtggttcttactcatgtacagcaagctggagtggaagaaagaaactgggtggaaagaaataagctactcctgttccagtggtccacaggggt
 ctgcacaaatcaccacacagactaagaggtctctccggactccgggtaaa

Sequência de nucleótidos da cadeia leve de RX1

atggatcccacacctcagttcctgtatttttggctttctggattccagctccagagtgagacacttggtagctcagttcctcagtcactcctcaggtcagtagagagagagtagtcaggtttc
 tccctgagggcagctcagagcattggacaagcatacactggtatcagcaaaagacaactgggtctccagggctctctcataaagatggtctctgggtctatctctggatcctctccaggtctt
 agtggcagtggtcagggacagatttactcttagatcaacagctggagatattagatattactgtcaacaataataagctggcccaaccagctcgggggggggacaaag
 ttggaaataaaacggctgactgcccacactgtatcaactctcccaccatccagtgagcattcaacactggagggctcactcagtcogtggctctctgaaacactctaccaccaagacac
 aatgtcaagtggaaagattgattggcagtgaaagcaaaatggcctcctgaaacagttggactgactcagggacagaaagcagccctacagpatgagcagccactccgcttggaccagggacagag
 tatgaaagacataacagctataactgtgagggcactcaaaagatcaacttacccttggcagaggttcaacaggaatgaggt

FIG. 5A

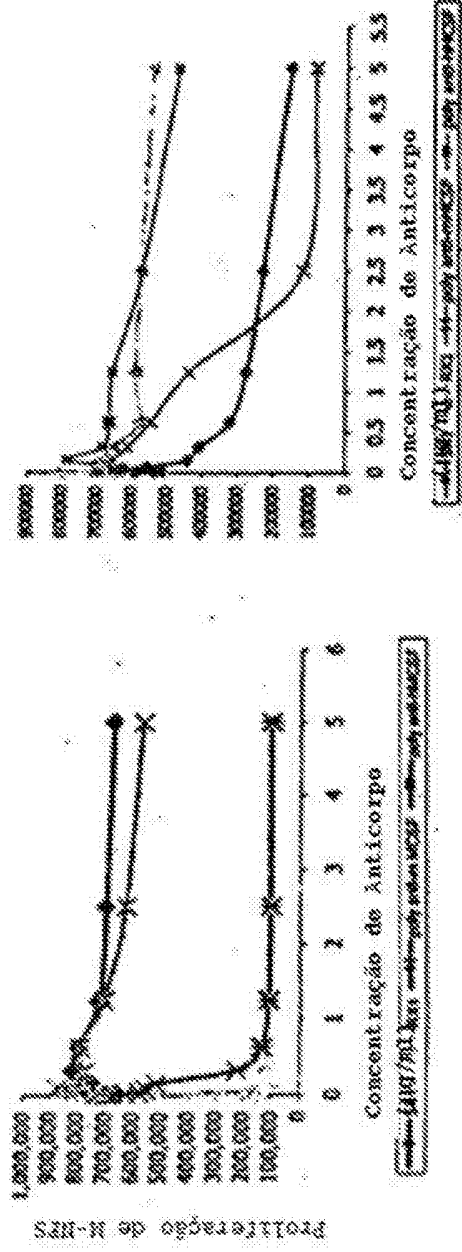
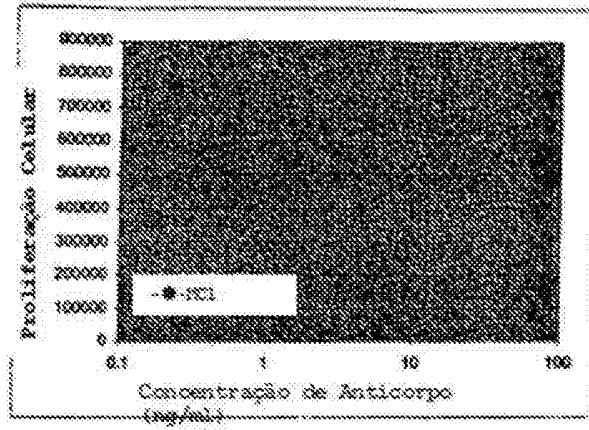


FIG. 5B

MC1 Neutraliza a atividade de MCSF humano



MC3 Neutraliza a atividade de MCSF humano

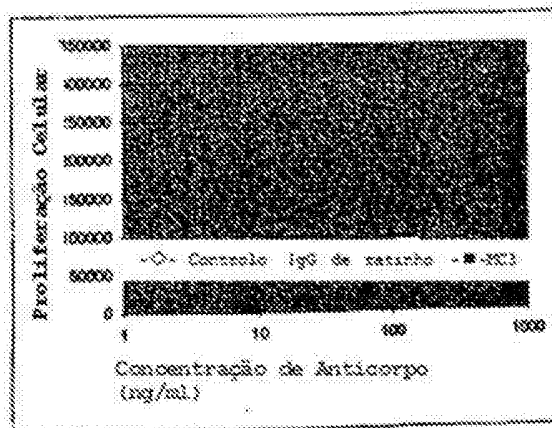
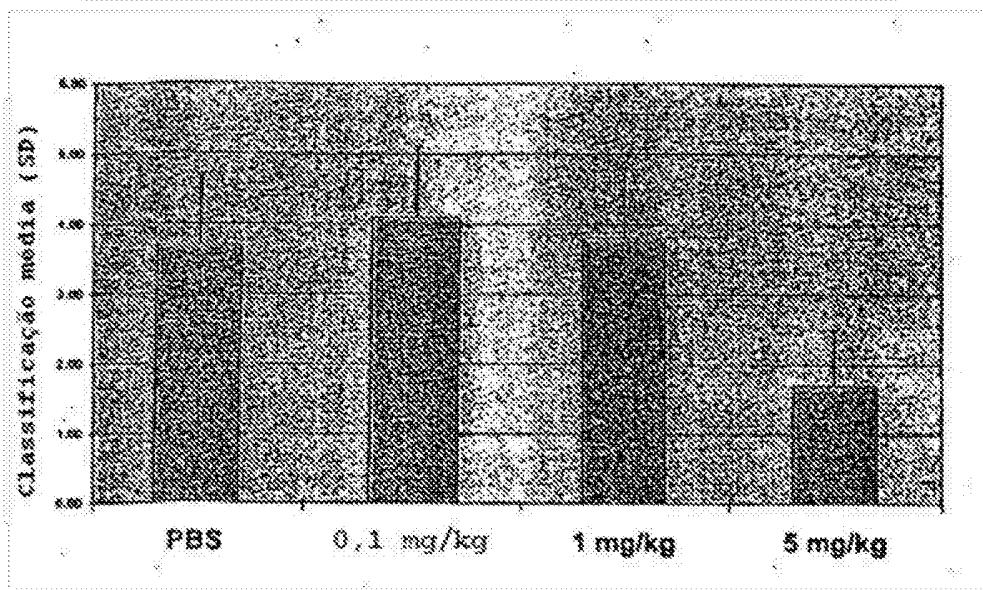


Fig. 6



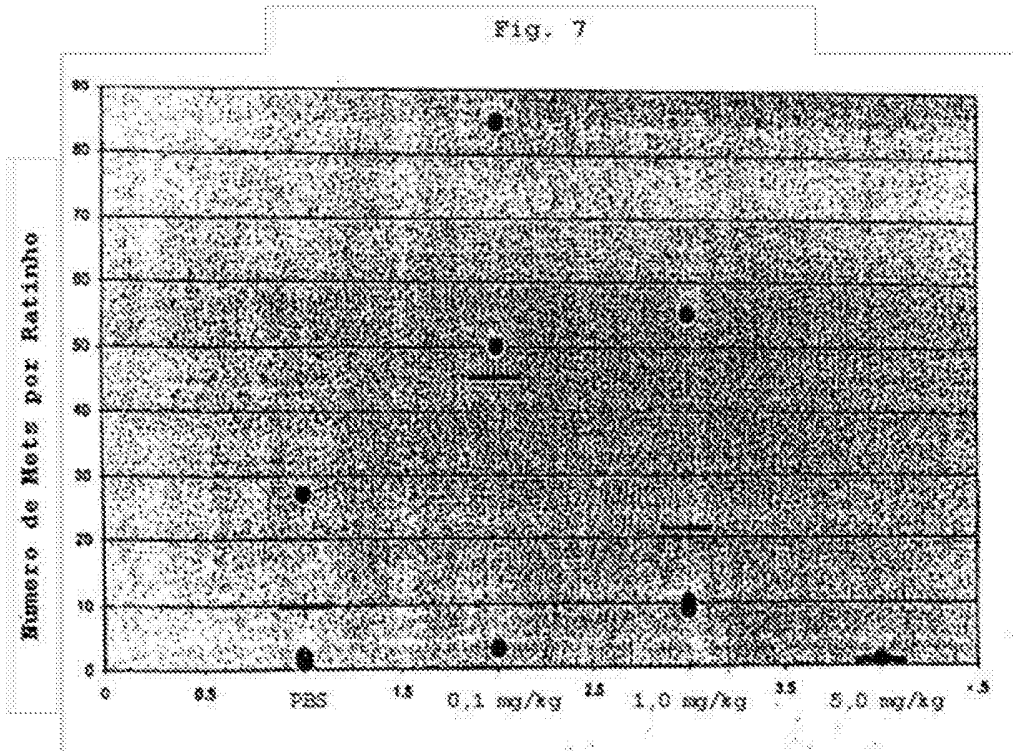


FIG. 8A

Ligação de anticorpo específico de MCSF à linha celular de cancro da mama MDA231

Vermelho: sem controlo de anticorpo
Preto: anticorpo M-CSF 1 µg/ml
Verde: anticorpo M-CSF 10 µg/ml
Azul: anticorpo M-CSF 50 µg/ml

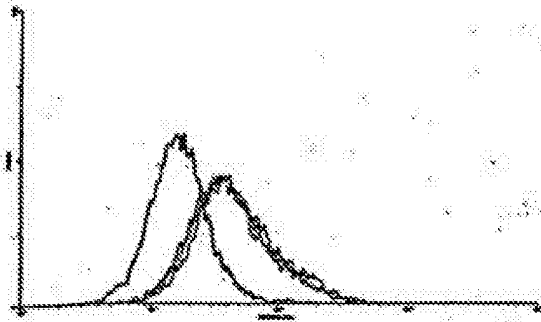


FIG. 8B

Ligação de anticorpo específico de MCSF à linha celular de mieloma múltiplo ARB77

Vermelho: sem controlo de anticorpo
Verde: anticorpo M-CSF 5 µg/ml
Azul: CONTROLO IgG2a 5 µg/ml

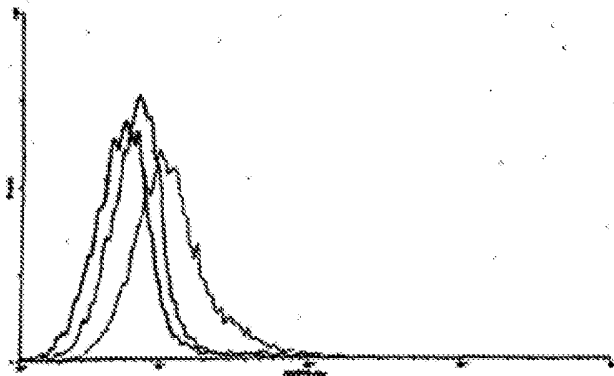


FIG. 9

Tipo de Cancro	Estádio de Cancro	Classif. 0	Classif. 1	Classif. 2	Classif. 3	Classif. 4	% com classif. 3 ou mais
adrenal	normal	10	5	5	0	0	0
células basais	cancro	5	0	0	0	0	0
bexiga	normal	6	1	2	1	0	10
cérebro	normal	17	1	2	0	0	0
mama	Cancro	6	5	13	62	0	72
mama	Normal	7	5	7	6	0	24
Carcinoides	Cancro	9	2	2	0	0	0
carcinoides (músculo)	Cancro	1	0	1	0	0	0
coriocarcinoma	Cancro	1	0	0	0	0	0
cólon	Normal	4	0	2	0	0	0
cólon	Cancro	9	0	1	4	0	27
fibrossarcoma	Cancro	3	1	0	0	0	0
vesícula biliar	Normal	2	1	0	1	0	25
célula germinal	Cancro	1	0	0	0	0	0
coração	Normal	7	3	2	4	0	25
rím	Normal	5	10	1	4	0	20
rím	Cancro	8	1	0	3	0	25
leiomiomasarcoma	Cancro	5	0	0	0	0	0
fígado	Normal	11	3	4	1	0	5
fígado	Cancro	5	3	0	3	0	27
pulmão	Normal	19	0	1	0	0	0
pulmão	Cancro	3	1	0	3	0	43
linfoma	Cancro	13	0	3	2	0	12
melanoma	Cancro	7	0	2	5	0	36
melanoma (inflamação)	Cancro	0	0	0	1	0	100
mesotelioma	Cancro	6	0	0	0	0	0
neuroblastoma	Cancro	1	0	0	0	0	0
ovário normal	normal	6	0	2	0	0	0
ovário	Cancro	8	2	0	4	0	29
pâncreas	Normal	9	2	5	4	0	20
pâncreas	Cancro	8	1	0	3	0	25
próstata	Normal	0	3	8	3	0	21
próstata	Cancro	9	1	1	4	0	27
sarcoma todos	Cancro	6	0	2	2	0	20
Sarcoma	Cancro	3	0	2	1	0	17
sarcoma (rím)	Cancro	3	0	2	1	0	17
Sarcoma mfn	Cancro	2	0	0	0	0	0
seminoma	Cancro	3	0	0	0	0	0
intestino delgado	Normal	2	1	0	1	0	25
baço	Normal	14	2	3	0	0	0
célula escamosa	Cancro	3	0	0	0	0	0
estômago	Normal	3	2	2	1	0	13
estômago	Cancro	7	1	1	1	0	10
teratoma	Cancro	1	0	0	0	0	0
testículos	Normal	5	1	3	3	0	25
tiróide	Normal	15	0	0	0	0	0
tiróide	Cancro	6	2	1	2	0	18
indif	Cancro	6	0	2	1	0	11
indif todos	cancro	5	0	2	0	0	0

Fig. 10

Met	Thr	Ala	Pro	Gly	Ala	Ala	Gly	Arg	Cys	Pro	Pro	Thr	Thr	Trp	Leu
1				5					10					15	
Gly	Ser	Leu	Leu	Leu	Leu	Val	Cys	Leu	Leu	Ala	Ser	Arg	Ser	Ile	Thr
		20						25					30		
Glu	Glu	Val	Ser	Glu	Tyr	Cys	Ser	His	Met	Ile	Gly	Ser	Gly	His	Leu
		35					40					45			
Gln	Ser	Leu	Gln	Arg	Leu	Ile	Asp	Ser	Gln	Met	Glu	Thr	Ser	Cys	Gln
	50					55						60			
Ile	Thr	Phe	Glu	Phe	Val	Asp	Gln	Glu	Gln	Leu	Lys	Asp	Pro	Val	Cys
	65				70					75					80
Tyr	Leu	Lys	Lys	Ala	Phe	Leu	Leu	Val	Gln	Asp	Ile	Met	Glu	Asp	Thr
				85					90					95	
Met	Arg	Phe	Arg	Asp	Asn	Thr	Pro	Asn	Ala	Ile	Ala	Ile	Val	Gln	Leu
			100					105						110	
Gln	Glu	Leu	Ser	Leu	Arg	Leu	Lys	Ser	Cys	Phe	Thr	Lys	Asp	Tyr	Glu
		115					120						125		
Glu	His	Asp	Lys	Ala	Cys	Val	Arg	Thr	Phe	Tyr	Glu	Thr	Pro	Leu	Gln
		130					135					140			
Leu	Leu	Glu	Lys	Val	Lys	Asn	Val	Phe	Asn	Glu	Thr	Lys	Asn	Leu	Leu
	145				150					155					160
Asp	Lys	Asp	Trp	Asn	Ile	Phe	Ser	Lys	Asn	Cys	Asn	Asn	Ser	Phe	Ala
				165					170					175	
Gln	Cys	Ser	Ser	Gln	Gly	His	Glu	Arg	Gln	Ser	Glu	Gly	Ser	Ser	Ser
			180					185						190	
Pro	Gln	Leu	Gln	Glu	Ser	Val	Phe	His	Leu	Leu	Val	Pro	Ser	Val	Ile
		195					200						205		
Leu	Val	Leu	Leu	Ala	Val	Gly	Gly	Leu	Leu	Phe	Tyr	Arg	Trp	Arg	Arg
	210					215						220			
Arg	Ser	His	Gln	Glu	Pro	Gln	Arg	Ala	Asp	Ser	Pro	Leu	Glu	Gln	Pro
	225				230						235				240
Glu	Gly	Ser	Pro	Leu	Thr	Gln	Asp	Asp	Arg	Gln	Val	Glu	Leu	Pro	Val
				245					250						255

Fig. 11

Met	Thr	Ala	Pro	Gly	Ala	Ala	Gly	Arg	Cys	Pro	Pro	Thr	Thr	Trp	Leu
1				5					10					15	
Gly	Ser	Leu	Leu	Leu	Leu	Val	Cys	Leu	Leu	Ala	Ser	Arg	Ser	Ile	Thr
		20						25					30		
Glu	Glu	Val	Ser	Glu	Tyr	Cys	Ser	His	Met	Ile	Gly	Ser	Gly	His	Leu
		35				40						45			
Gln	Ser	Leu	Gln	Arg	Leu	Ile	Asp	Ser	Gln	Met	Glu	Thr	Ser	Cys	Gln
		50				55					60				
Ile	Thr	Phe	Glu	Phe	Val	Asp	Gln	Glu	Gln	Leu	Lys	Asp	Pro	Val	Cys
		65			70					75				80	
Tyr	Leu	Lys	Lys	Ala	Phe	Leu	Leu	Val	Gln	Asp	Ile	Met	Glu	Asp	Thr
				85					90					95	
Met	Arg	Phe	Arg	Asp	Asn	Thr	Pro	Asn	Ala	Ile	Ala	Ile	Val	Gln	Leu
				100					105				110		
Gln	Glu	Leu	Ser	Leu	Arg	Leu	Lys	Ser	Cys	Phe	Thr	Lys	Asp	Tyr	Glu
		115				120						125			
Glu	His	Asp	Lys	Ala	Cys	Val	Arg	Thr	Phe	Tyr	Glu	Thr	Pro	Leu	Gln
		130				135					140				
Leu	Leu	Glu	Lys	Val	Lys	Asn	Val	Phe	Asn	Glu	Thr	Lys	Asn	Leu	Leu
		145			150					155				160	
Asp	Lys	Asp	Trp	Asn	Ile	Phe	Ser	Lys	Asn	Cys	Asn	Asn	Ser	Phe	Ala
			165						170					175	
Glu	Cys	Ser	Ser	Gln	Asp	Val	Val	Thr	Lys	Pro	Asp	Cys	Asn	Cys	Leu
		180						185						190	
Tyr	Pro	Lys	Ala	Ile	Pro	Ser	Ser	Asp	Pro	Ala	Ser	Val	Ser	Pro	His
		195						200					205		
Gln	Pro	Leu	Ala	Pro	Ser	Met	Ala	Pro	Val	Ala	Gly	Leu	Thr	Trp	Glu
		210				215						220			
Asp	Ser	Glu	Gly	Thr	Glu	Gly	Ser	Ser	Leu	Leu	Pro	Gly	Glu	Gln	Pro
		225			230						235				240
Leu	His	Thr	Val	Asp	Pro	Gly	Ser	Ala	Lys	Gln	Arg	Pro	Pro	Arg	Ser
			245						250					255	
Thr	Cys	Gln	Ser	Phe	Glu	Pro	Pro	Glu	Thr	Pro	Val	Val	Lys	Asp	Ser
		260						265					270		
Thr	Ile	Gly	Gly	Ser	Pro	Gln	Pro	Arg	Pro	Ser	Val	Gly	Ala	Phe	Asn
		275				280							285		
Pro	Gly	Met	Glu	Asp	Ile	Leu	Asp	Ser	Ala	Met	Gly	Thr	Asn	Trp	Val
		290				295						300			
Pro	Glu	Glu	Ala	Ser	Gly	Glu	Ala	Ser	Glu	Ile	Pro	Val	Pro	Gln	Gly
		305			310					315				320	
Thr	Glu	Leu	Ser	Pro	Ser	Arg	Pro	Gly	Gly	Gly	Ser	Met	Gln	Thr	Glu
		325						330						335	
Pro	Ala	Arg	Pro	Ser	Asn	Phe	Leu	Ser	Ala	Ser	Ser	Pro	Leu	Pro	Ala
		340						345					350		
Ser	Ala	Lys	Gly	Gln	Gln	Pro	Ala	Asp	Val	Thr	Gly	Thr	Ala	Leu	Pro
		355				360						365			
Arg	Val	Gly	Pro	Val	Arg	Pro	Thr	Gly	Gln	Asp	Trp	Asn	His	Thr	Pro
		370				375					380				
Gln	Lys	Thr	Asp	His	Pro	Ser	Ala	Leu	Leu	Arg	Asp	Pro	Pro	Glu	Pro
		385			390					395				400	
Gly	Ser	Pro	Arg	Ile	Ser	Ser	Leu	Arg	Pro	Gln	Gly	Leu	Ser	Asn	Pro
		405							410					415	
Ser	Thr	Leu	Ser	Ala	Gln	Pro	Gln	Leu	Ser	Arg	Ser	His	Ser	Ser	Gly
		420						425					430		
Ser	Val	Leu	Pro	Leu	Gly	Glu	Leu	Glu	Gly	Arg	Arg	Ser	Thr	Arg	Asp
		435				440						445			
Arg	Arg	Ser	Pro	Ala	Gln	Pro	Gln	Gly	Gly	Pro	Ala	Ser	Glu	Gly	Ala
		450				455					460				
Ala	Arg	Pro	Leu	Pro	Arg	Phe	Asn	Ser	Val	Pro	Leu	Thr	Asp	Thr	Gly
		465			470					475				480	
His	Glu	Arg	Gln	Ser	Glu	Gly	Ser	Ser	Ser	Pro	Gln	Leu	Gln	Gln	Ser
		485						490						495	
Val	Phe	His	Leu	Leu	Val	Pro	Ser	Val	Ile	Leu	Val	Leu	Leu	Ala	Val
		500						505					510		
Gly	Gly	Leu	Leu	Phe	Tyr	Arg	Trp	Arg	Arg	Arg	Ser	His	Gln	Gln	Pro
		515				520						525			
Gln	Arg	Ala	Asp	Ser	Pro	Leu	Glu	Gln	Pro	Glu	Gly	Ser	Pro	Leu	Thr
		530				535						540			
Gln	Asp	Asp	Arg	Gln	Val	Glu	Leu	Pro	Val						

Fig. 12

Met Thr Ala Pro Gly Ala Ala Gly Arg Cys Pro Pro Thr Thr Trp Leu
 1 5 10 15
 Gly Ser Leu Leu Leu Leu Val Cys Leu Ala Ser Arg Ser Ile Thr
 20 25 30
 Glu Glu Val Ser Glu Tyr Cys Ser His Met Ile Gly Ser Gly His Leu
 35 40 45
 Gln Ser Leu Gln Arg Leu Ile Asp Ser Gln Met Glu Thr Ser Cys Gln
 50 55 60
 Ile Thr Phe Glu Phe Val Asp Gln Glu Gln Leu Lys Asp Pro Val Cys
 65 70 75 80
 Tyr Leu Lys Lys Ala Phe Leu Leu Val Gln Asp Ile Met Glu Asp Thr
 85 90 95
 Met Arg Phe Arg Asp Asn Thr Pro Asn Ala Ile Ala Ile Val Gln Leu
 100 105 110
 Gln Glu Leu Ser Leu Arg Leu Lys Ser Cys Phe Thr Lys Asp Tyr Glu
 115 120 125
 Glu His Asp Lys Ala Cys Val Arg Thr Phe Tyr Glu Thr Pro Leu Gln
 130 135 140
 Leu Leu Glu Lys Val Lys Asn Val Phe Asn Glu Thr Lys Asn Leu Leu
 145 150 155 160
 Asp Lys Asp Trp Asn Ile Phe Ser Lys Asn Cys Asn Asn Ser Phe Ala
 165 170 175
 Glu Cys Ser Ser Gln Asp Val Val Thr Lys Pro Asp Cys Asn Cys Leu
 180 185 190
 Tyr Pro Lys Ala Ile Pro Ser Ser Asp Pro Ala Ser Val Ser Pro His
 195 200 205
 Gln Pro Leu Ala Pro Ser Met Ala Pro Val Ala Gly Leu Thr Trp Glu
 210 215 220
 Asp Ser Glu Gly Thr Gln Gly Ser Ser Leu Leu Pro Gly Glu Gln Pro
 225 230 235 240
 Leu His Thr Val Asp Pro Gly Ser Ala Lys Gln Arg Pro Pro Arg Ser
 245 250 255
 Thr Cys Gln Ser Phe Glu Pro Pro Glu Thr Pro Val Val Lys Asp Ser
 260 265 270
 Thr Ile Gly Gly Ser Pro Gln Pro Arg Pro Ser Val Gly Ala Phe Asn
 275 280 285
 Pro Gly Met Glu Asp Ile Leu Asp Ser Ala Met Gly Thr Asn Trp Val
 290 295 300
 Pro Glu Glu Ala Ser Gly Glu Ala Ser Glu Ile Pro Val Pro Gln Gly
 305 310 315 320
 Thr Glu Leu Ser Pro Ser Arg Pro Gly Gly Gly Ser Met Gln Thr Glu
 325 330 335
 Pro Ala Arg Pro Ser Asn Phe Leu Ser Ala Ser Ser Pro Leu Pro Ala
 340 345 350
 Ser Ala Lys Gly Gln Gln Pro Ala Asp Val Thr Gly His Glu Arg Gln
 355 360 365
 Ser Glu Gly Ser Ser Ser Pro Gln Leu Gln Glu Ser Val Phe His Leu
 370 375 380
 Leu Val Pro Ser Val Ile Leu Val Leu Leu Ala Val Gly Gly Leu Leu
 385 390 395 400
 Phe Tyr Arg Trp Arg Arg Arg Ser His Gln Glu Pro Gln Arg Ala Asp
 405 410 415
 Ser Pro Leu Glu Gln Pro Glu Gly Ser Pro Leu Thr Gln Asp Asp Arg
 420 425 430
 Gln Val Glu Leu Pro Val

FIG. 13

Sequência proteica da cadeia pesada de 5H4

```

1   EIQLQSSQPE LVTGDTSEVKI SCKASGYSFT GYFMHWVKQS HSKSLEWICY
51  ILCYNGDTWY NQNFKGNATF TNDTSSSTAY NQPNELTSED SAVYYCARBG
101 GNYFAYWQQG TLVTVSAAKT TPSPVYPLAP GSAAGTNSMV TLQCLVRSYF
151 PEPVYVWNS GSLSEGVHTF PAVLQSDLYT LSSSVTVFSS TWPSETVICN
201 VANPASSTEV DKKIVPRDCG CKPCICVPE VSEVFIFFPK PKDVLITILT
251 PKVTCVVVDI SKDDPEVQFS WFDGVEVHT AQTOPRESSQF NSTFRSVSEL
301 PIMHQDLNG KEFECRVNSA AFFAFIEKTI SETKORPKAF QVYTIIPPKK
351 QMAEDKVELT CHITDFFPED ITVEMQWNGQ PAENYKNTQP INDTDGSEYFV
401 YSKLNVQKSN WEAGNTFFCS VLHEGLDRRH TEKSLNSPG K

```

Sequência proteica da cadeia leve de 5H4

```

1   DIVMTQSHKP MSTSVGDRVT ITCKASQNWG TAVTWYQQKF GQSPKLLIYW
51  TSTRAGVPE RFTSGSGQTD FTLTISDVQS EDLADYFCQQ YSSYPLTFQA
101 GTRLELRAD AAPTVEIFPP SSRQLTSCGA SVVCFLRNFY PKDINVKWCI
151 DGSRQNOVL NSWTDQDSKD STYNSSTLT LTEDYERHW SYTCBATWET
201 STSFIVKSN RNEC

```

FIG. 14

Sequência proteica da cadeia pesada de MC-1

```

1   EVKLVESGQG LQPPGGSLAL SCATSGPTFS DYMYWVRQT PEKRLWVAY
51  IANGGGSTTY PDTYGRPTI SRDANKNTLY LQMSRLKSED TANYYCARGG
101 SYGYPFAYWG QGTLVTYSAA KYTAPSVYPL AFVCSDTTGS SVTLGCLVRG
151 YFPEPVTLW NSQSLEGGVN TFFAVLQSDL YTLSSVTVT SSTWPSQSIT
201 CNVANPASST KYDKRIEPRG PTIKPCFPCK CPAPHLLOGP SVFIFPPKIK
251 DVLNISLSPF VTCYVVDVSE CDPEVQISWF VNVVEVHTAQ TQTHREDVNS
301 TLRVVSALPI QWQWMEGKE FRCVNNHDL PAFIERTIEK PGEVRAPOV
351 YVLEPPFEEM TKKQVTLICM VTDPMFSDIY VEWTHNGKTE LHYKNTPEVL
401 DSDGSEYFNYS KLAVERKRWV ERNSYSCSVY RGLGNHHTT KSFRTFPGK

```

Sequência proteica da cadeia leve de MC-1

```

1   AIQMTQTTS LGASLGRVT ISCEASQGIH NYLNWYQQKF DGTVELLIYY
51  TSSLNSGVPS RFGSGSOTD YSLTISNLEP EDIATYVCQG YSKLFWTFQG
101 GTKLEIKRAD AAPTUSIFPP SSEQLTSGGA SVVCFLWNSY PKDINVKWKI
151 DGSEKQNOVL NSWYDQSKD STYSMSSTLT LYXDEYERHW SYTCEATHKT
201 STSPIVKSPW RNEC

```

FIG 15.

Sequência proteica da cadeia pesada de MC-3

```

1   DVQLQESGPN LVKFSQLESL TCTVTCYSIT SDYAMNWIRO PFGNKLQMMG
51  YISYSGSTSY NFKLKRISI TRDTSKNQFF LQLNSVTED TATYCARLE
101 TWLFDYMGQG TILTVSSAKT TFFSVYPLAP GGDYTGSSV TIGCLVEGYF
151 PESVTVTWSN GELSSGVNTP PALLQSGLYT KSSSVTVPSK TWPSQTVTCS
201 VANPASSTYV DKKLEPSSPI STINPCPPCK RCHKCPAPNL SGGPSEVFIFF
251 PWIKDVLNIS LTPKVTQVWV DVSEDDPDVQ ISWFVNNVEV HTAQTQTHRE
301 DYNSTIRVVS TLPICHQDWM SKKEPKCKVN NEDLPEPIR TIRKINGLVR
351 APQVYILPPP AEQLSRKQVS LTCLVQCFNP GDISVWTSN GHTRENYKDY
401 APYLDSDGSY FIYKLNKMT SKWKTSSPS CNVRSGLKN YLKKTISRS
451 PGLDLDDICA KARDGELDGL WTTITIFISL FLLSVCYSAS VTLPKVKNIF
501 SSVVELKQKI SPDKRNHIGQ GA

```

Sequência proteica da cadeia leve de MC-3

```

1   DILLTQSPAI LSVSPGERVS FCRASQSIG TSHWYQORT NGSPLLIKY
51  ASKSISGIPS RFSGSSGGTD FTLSINSVES EDIADYCGQ SWSWPTTFGG
101 GTKLEIKMAD AAPTVEIFPP SSEQLTSGQA SVVCFLNPFY PKDINVKKI
151 DGSEHQNGVL NSWIDQSKD STYSMSSTLT LTKDEYKKN SYTCEATHKT
201 STSPIVKSN RNEC

```

FIG. 16A

Para a CDR1 da cadeia pesada:

		1	
H_CDR1_5H4	(1)	-G	YFMH
H_CDR1_MC-1	(1)	-	YMY
H_CDR1_CHIR-RX1	(1)		
H_CDR1_MC-3	(1)		
consenso	(1)	S	DYAWN

Para a CDR2 da cadeia pesada:

		1		17
H_CDR2_5H4	(1)	Y	I	S
H_CDR2_MC-1	(1)	Y	I	S
H_CDR2_CHIR-RX1	(1)	Y	I	S
H_CDR2_MC-3	(1)	Y	I	S
consenso	(1)	Y	I	S

Para a CDR3 da cadeia pesada:

		1	
H_CDR3_5H4	(1)	--	K
H_CDR3_MC-1	(1)	Q	G
H_CDR3_CHIR-RX1	(1)	-	F
H_CDR3_MC-3	(1)	--	L
consenso	(1)	D	Y

FIG. 16B

Para a CDR1 da cadeia leve

		1	11
L_CDR1_5H4	(1)	RASQ	ST
L_CDR1_MC-1	(1)	RASQ	SNYIN
L_CDR1_CHIR-RX1	(1)	RASQ	ST
L_CDR1_MC-3	(1)	RASQ	ST
consenso	(1)	RASQSIGTSIR	

Para a CDR2 da cadeia leve

		1
L_CDR2_5H4	(1)	STRM
L_CDR2_MC-1	(1)	SLM
L_CDR2_CHIR-RX1	(1)	STRM
L_CDR2_MC-3	(1)	STRM
consenso	(1)	YTSESI

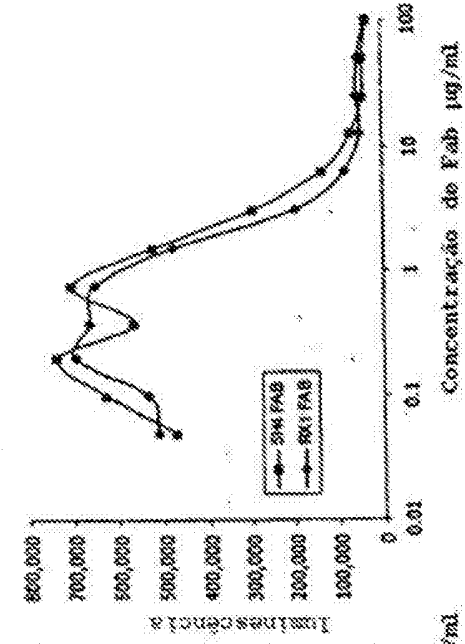
Para a CDR3 da cadeia leve

		1
L_CDR3_5H4	(1)	QQINSLP
L_CDR3_MC-1	(1)	QQLKLSWT
L_CDR3_CHIR-RX1	(1)	QQINSLP
L_CDR3_MC-3	(1)	QQSNP
consenso	(1)	QQYSSWPTT

FIG. 17

Atividades de neutralização de mAbs intatos vs. Fabz

Fab



mAb intato

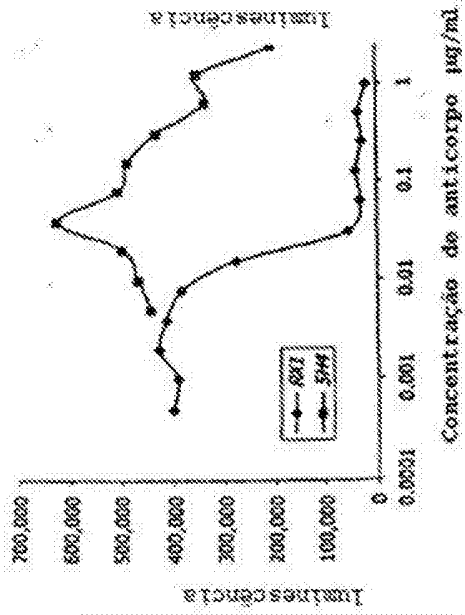
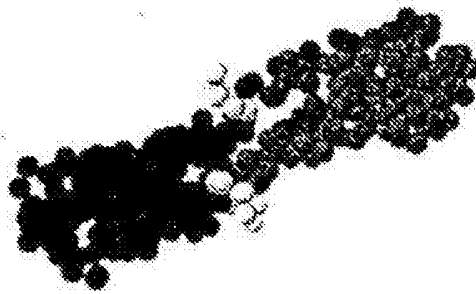


FIG. 18

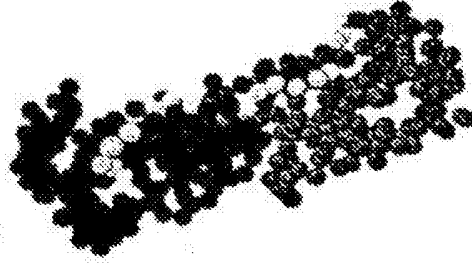
Estrutura de MCSE com os Epítotos RX1 Destacados

RX1



R₉₈FRDNTPN₁₀₅

5H4



I₆₅TFEFVDQE₇₃

MC3



I₆₅TFEFVDQE₇₃

F₁₃₈YETPLQ₁₄₄

FIG. 19B

Cadeia Pesada de Risco Baixo Vs. Sequência Consenso Vh2 de Kabat**Sequência proteica:**

DVQLQESFGPIVKPSQTLSLCTVSDYISHSYAWWIRPFQPKLEWIMGYISGISTYNSFLKSRITSRDTSKQSLQNSVTAADTATYYCASFDYAHAMD
YWGQGITVTVSS

Sequência de DNA

GACGTACAACCTTCAGAACTGTGGCCAGGCTCTCCCAACCTTCTCAAACTCTCAGTCACTGACCTGACTGACTCTATTACTGCGACTACGGCTT
GGAACTGGATCGGACAAATTCCTGGTAAAGAACCGAATGGATGGTTAATTTCTACTCTGGCTCCAGCTCTACAATCCCTCTCTGAAATCAGCGATCAC
AATTTCCCGGATACCTTAATAAATCAATTTCACTCCAACTCAATTCCTACCCCGGGATACCTGACCTGAGCTCTGCTTTGACTACGGCTCAGG
CCATGGATTATTGGGACAGGGTACTACCGTACCGTAAGCTCA

Cadeia Pesada de Risco Baixo + Mod. Vs. Sequência Consenso Vh2 de Kabat**Sequência proteica:**

QVQLQESFGPIVKPSQTLSLCTVSDYISHSYAWWIRPFQPKLEWIMGYISGISTYNSFLKSRITSRDTSKQSLQNSVTAADTAVYYCASFDYAHAMD
YWGQGITVTVSS

Sequência de DNA

CAAGTTCAACTTCAGAACTGAGCCCGGACTCGTTAAACCCTCTCAAACTCTCTCTTACTTGGACTGTATDGGATFACTCTATTACTTCAGACTACGGCTTG
GAACTGGATCAGACAAATTCCTGGTAAAGAACCGAATGGATGGATAATCTCTACTCTGGCTCAACTCTTACAACCCCTCTCAAAATCTCGAATAAC
AATTCACCGGATACCTTAATAAATCAATTTCACTCCAACTCAATTCCTACCCCGGGTACTGCGCGGACTGCGGTTACTACTGCTTCCCTTCCGATACGGCTCAGG
CTATGGATTATTGGGACAGGAACTACCGTCACTGCTCAGCTCA

FIG. 20A

Cadeia Leve

Região V	N.º de modificações	Aminoácidos 1-52
Elenco		LHLHLMLLMLHLMLLHLHLMLMHHHHHHHHHHHMLMLMHHHHHHH
Estiúpe		DILLTQSPAILSVSPGERVSPCRASQSIGTSIH---WYQRTNGSPRLLIKYS
Humano		EIVLTQSPYTLISLSPGERATLSPCRASQSVAAVY---AWYQKPGQAPRLLIYAS
Risco Baitoz	8	EIVLTQSPGTLISVSPGERVTFPCRASQSIGTSIH---WYQKTKGQSPRLLIKYS
Risco Baitoz + Mod.	9	EIVLTQSPGTLISVSPGERVTFPCRASQSIGTSIH---WYQKTKGQAPRLLIKYS

Região V	N.º de modificações	Aminoácidos 53-109
Elenco		HLMLRMLMLHLMLHLMLLHLMLLHHHHHHHHHHHHHHHHHHHLMLHLMLL
Estiúpe		ESISGIPSRPFGSGSGTDFTLISNVESEDIADYCCQINSWPT-----TFGQGTKLEI-KRA
Humano		SRATGIPDRPFGSGSGTDFTLTISRLPEDEAVYCCQYgsepp-----XTFGGQTKVET-KRT
Risco Baitoz	8	ERISGIPDRPFGSGSGTDFTLISRVESEDFADYCCQINSWPT-----TFGQGTKLEI-KRT
Risco Baitoz + Mod.	10	ERATGIPDRPFGSGSGTDFTLISRVESEDFADYCCQINSWPT-----TFGQGTKLEI-KRT

FIG. 20B

Cadeia Leve de Risco Baixo Vs. Sequência Consenso Vk3 de Kabat

Sequência proteica:

EIVLTQSPGTLSPGERVITFCRASQSIGTSIRWYQQKTCQSPRLLIKYSERISGIPDRFSQSGSDTFLISRVESEDFADYYCQQNSWPTTFGGTKLEKRT

Sequência de nucleótidos:

GAAATAGTCTTACCCAAATCCCGGAAACCTCTCAGTATCCCGGGGAACGAGTAACCTTTTCATGTAGACCATCCCAATCCATCGGCACCTTCAATTCAC
GGTATCAGCAGAAACAGGTCAAATCCCAAGGCTTCTTATAAAATATGCATCAGAAAGAAATATCAGGCATTCAGACAGAGATTCTCAGGTTCAGGTTGAGGC
ACAGACTTCACACTTACAAATTTCCCGGTCGAAATCCGAGACTTGGCTGACTATTACTGCCAACAAATCAACTCAATGGCTACTACTATTCTGGTCAAGGCACC
AAACTCGAAATTAACGTACG

Cadeia Leve de Risco Baixo + Mod. Vs. Sequência Consenso Vk3 de Kabat

Sequência proteica:

EIVLTQSPGTLSPGERVITFCRASQSIGTSIRWYQQKTCQAPRLLIKYASERATGIPDRFSQSGSDTFLISRVESEDFADYYCQQNSWPTTFGGTKLEKRT

Sequência de nucleótidos:

GAAATAGTCTTACTCAATCCCGGATACACTCTCAGTTCCCAAGGGAACGGCTCAGCTTTTCTTCCAGAGCATCAAAATCAATCCGACCTTCAATTCATT
GGTATCAACAAAAACAGGACAGGCCCAAGACTTCTTATAAATATGCATCAGAACGAGCCACAGGCATCCAGACAGAGATTTTCAGGTTCAGGATCAGGC
ACCGATTTACACTTACAAATATCCAGATCGAAATCAGAAGATTTGCAGATTACTATTGTCAAACAAATAAACAGCTGGGCCACTACATTCGGACAAGGCACA
AAACTCGAAATTAACGTACG

FIG. 21B

Cadeia Leve de Risco Baixo Vs. Sequência consenso Vk3 de Kabat; AA54 alterado para aminoácido de murino

Sequência Proteica:

EIVLTQSPGTLVSPGERVTFSCRASQSIGTSHHWYQKNTGQSPRLLIKYASESIGHPRFSQSGSDFTLTISRVESEDFADYYCQQRSWPTTFGQGTKLEIKRT

Sequência de Nucleótidos:

GAAATAGTCTTACCCAAATCTCCGGAACCCCTCAGTATCTCCGGGAACGAGTAACCTTTTCATGTAGAGCATCCCAAATCCATCGGCACCTTCAATTCACT
GGTATCAGCAGAAAACAGCTCAATCCCCACGGCTCTTATAAAAATATGCATCAGAAATCAATTTCTGGCATCCACAGACAGATTTTCAGGATCAGGATCAGGCCA
CCGATTTACACTTACAATAATCCAGAGTCCGAATCAGAGAATTTTGCAGATTACTATTTCTCAACAAATAAACAGAGCTGGCCACTACATTCGGACAAAGGCACAAA
AACTCGAAAATTAAACGTACG

Cadeia Leve de Risco Baixo + Mod Vs. Sequência consenso Vk3 de Kabat;
AA54, 55, 56 alterados para aminoácidos de murino

Sequência Proteica:

EIVLTQSPGTLVSPGERVTFSCRASQSIGTSHHWYQKNTGQAPRLLIKYASESIGHPRFSQSGSDFTLTISRVESEDFADYYCQQRSWPTTFGQGTKLEIKRT

Sequência de Nucleótidos:

GAAATAGTCTTACTCAATCCCGGTACACTCTCAGTTTCCCAGGGCAAGGGTCACTTTTCTTGCAGAGCATCACAATCAATCCGCACCTTCAATTCATT
GGTATCAACAATAACAGCAGACGCCCCAGACTTCTTATAATAATCCATCAGAAATCAATTTCTGGCATCCACAGACAGATTTTCAGGATCAGGATCAGGCCA
CCGATTTACACTTACAATAATCCAGAGTCCGAATCAGAGAATTTTGCAGATTACTATTTCTCAACAAATAAACAGCTGGCCACTACATTCGGACAAAGGCACAAA
AACTCGAAAATTAAACGTACG

FIG. 22B

Cadeia Leve de Risco Baixo vs. VK6 Subgrupo 2-1-(1) A14**Sequência Proteica:**

DIVLTQSPAFLSVTPGEKVTITCOASQSIGTSHHWYQKTDQSPRLLIKYASESISGIPSRFSGSGTDFTLTSSVEAEDAADYYCQINSWPTTIFGGGKLEIKRY

Sequência de Nucleótidos: Não sintetizada**Cadeia Leve de Risco Baixo + Mod Vs. VK6 Subgrupo 2-1-(1) A14**

DIVLTQSPAFLSVTPGEKVTITCOASQSIGTSHHWYQKTDQAPKLLIKYASESISGIPSRFSGSGTDFTLTSSVEAEDAADYYCQQI
NSWPTTIFGGGKLEIKRY

Sequência de Nucleótidos:

GACATAGTTCACACAATCACCGGATTCCTCTCAGTTACACCGGCGAATAAGTAAGCTTTACCTGTGACGGCTTCACAATCTATCGGCACCTCTATTCACCT
GGTATCAACAAAAACCGATCAAGCTCCTAAACTCTCATAAAATAGCGATCCGAATCCAATCTCCGGTATCCCTCCAGATTTTCAGGCTCCGGCTCCGGCA
CAGATTCACCCCTTAECATTAGCTCAGTTGAAAGCCGAGACGACGCTGATTACTACTGTCAACAATAAACTCATGGCCCACTACTTCCGGCGGGGCACTA
AACTCGAAATAAAAAGGTACG

FIG. 23A

Cadeia leve de murino RX1

DILLTQSPAILSVSPGERVSPSCRASQSIQTSIHHWYQRTNGSPRLLIKYASESISQIPSRFSGSGSTQFTLSINSVESEDIADYYCCQINSMPTTFGGQIK
LEIKRA

RX1 XY (1) DILLTQSPAILSVSPGERVSPSCRASQSIQTSIHHWYQRTNGSPRLLIKYASESISQIPSRFSGSGSTQFTLSINSVESEDIADYYCCQINSMPTTFGGQIK
Consensus Germline IC
HX I Consensus (1) DILQVSPAILSVSPGERVSPSCRASQSIQTSIHHWYQRTNGSPRLLIKYASESISQIPSRFSGSGSTQFTLSINSVESEDIADYYCCQINSMPTTFGGQIK
HX II Consensus (1) DILVQSPAILSVSPGERVSPSCRASQSIQTSIHHWYQRTNGSPRLLIKYASESISQIPSRFSGSGSTQFTLSINSVESEDIADYYCCQINSMPTTFGGQIK
HX III Consensus (1) DILVQSPAILSVSPGERVSPSCRASQSIQTSIHHWYQRTNGSPRLLIKYASESISQIPSRFSGSGSTQFTLSINSVESEDIADYYCCQINSMPTTFGGQIK
HX IV Consensus (1) DILVQSPAILSVSPGERVSPSCRASQSIQTSIHHWYQRTNGSPRLLIKYASESISQIPSRFSGSGSTQFTLSINSVESEDIADYYCCQINSMPTTFGGQIK
HX V Consensus (1) DILVQSPAILSVSPGERVSPSCRASQSIQTSIHHWYQRTNGSPRLLIKYASESISQIPSRFSGSGSTQFTLSINSVESEDIADYYCCQINSMPTTFGGQIK
HX VI Consensus (1) DILVQSPAILSVSPGERVSPSCRASQSIQTSIHHWYQRTNGSPRLLIKYASESISQIPSRFSGSGSTQFTLSINSVESEDIADYYCCQINSMPTTFGGQIK

CADEIA LEVE amino half

RX-1 DILLTQSPAILSVSPGERVSPSCRASQSI-QTSIH-----HWYQRTNGSPRLLIKYAS

pos..	10	20	abcdef	30	40	50
-------	----	----	--------	----	----	----

Kabat:

HK1...DIQMTQSPSSLSASVGDQRTVTTTCRASQSLVYX-XISXIXHWYQKPKGKAPKLLIYXAS
HK2...DIWMTQSPLELPTTQEPASISCRSSQSLHSDGNTLWYLOKPKQSPQLLIYXAS
HK3...EIVLQSPFGTLSLGERATLSCRASQS-----VSSYLAWYQKPKGQAPRLIYXAS
HK4...DIWMTQSPDLSAVSLGERATINCKSSQSVLYSSNNKYLAWYQKPKQPPRLIYXAS

Linha germinal Consenso (com JK4)

HVK1 DIQMTQSPSSLSASVGDQRTVTTTCRASQS-----ISSYLAWYQKPKGKAPKLLIYXAS
HVK2 DIWMTQSPLELPTTQEPASISCRSSQSLHSDGNTLWYLOKPKQSPQLLIYXAS
HVK3 EIVLQSPFGTLSLGERATLSCRASQS-----VSSYLAWYQKPKGQAPRLIYXAS
HVK4 DIWMTQSPDLSAVSLGERATINCKSSQSVLYSSNNKYLAWYQKPKQPPRLIYXAS
HVK5 EITLQSPAFKATPKGKATVTSKASQIDP-----DMWYQKPKGQAPRLIYXAS
HVK6 EIVLQSPDQSVTFRKAVTTCRASQSIG-----SSLHWYQKPKQSPKLLIYXAS

FIG. 23B

CADEIA LEVE carboxi half

RX-1 ESISGIPSRFSGSGSGTDFTLSINSVESEDIADVYCCQINSWPT-----TFGGGTKLEI-KRA

pos... 60 70 80 90 abcdef 100 a

Kabat:

HK1... XLKSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQXXXPE-----XTPGGGTKVEI-KRT

HK2... NRKSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVVYCMQAKQXPR-----XTPGGGTKVEI-KRT

HK3... SRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEEFVAVYYCQYQSSPF-----XTPGGGTKVEI-KRT

HK4... TRESGVDRFSGSGSGTDFTLTISLQAEDVAVYYCQYVSTP-----XTPGGGTKVEI-KRT

Linha germinal Consenso (com JK4)

hVK1 SLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQSYSTP-----LTFGGGTKVEI-KRT

hVK2 YRASGVDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVVYCMQRIEFP-----LTFGGGTKVEI-KRT

hVK3 SRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEEFVAVYYCQYQSSP-----LTFGGGTKVEI-KRT

hVK4 TRESGVDRFSGSGSGTDFTLTISLQAEDVAVYYCQYVSTP-----LTFGGGTKVEI-KRT

hVK5 TLVPGIPDRFSGSGSGTDFTLTINNIESEDAAYYFCLQHDNFP-----LTFGGGTKVEI-KRT

hVK6 QSFSGVPSRFSGSGSGTDFTLTINSLEAEDAATYYCHQSSSLP-----LTFGGGTKVEI-KRT

FIG. 24A

Cadeia Pesada de murino RXI

DVQLQESQPLVVKPSQSLTCTVTDYSITSDYANNWIRQFPKNKLEWNGYISYSSQSTSYNPSLKRISLITRDTFSQOFFLQLSNVTTEDTATYYC
 ASFOYAHANDYMGQQTSTVSS

RX1 W (1) QVQLVQSGAEVKKPKGKASVVKVSKKASGYTFGTYMHR--WVROAPGCGLEWNGWVNIIP--NSCGT
 Consensus Gerbilline
 RVH I Consensus (1) QVQLVQSGAEVKKPKGKASVVKVSKKASGYTFGTYMHR--WVROAPGCGLEWNGWVNIIP--NSCGT
 RVH II Consensus (1) QVQLVQSGAEVKKPKGKASVVKVSKKASGYTFGTYMHR--WVROAPGCGLEWNGWVNIIP--NSCGT
 RVH III Consensus (1) QVQLVQSGAEVKKPKGKASVVKVSKKASGYTFGTYMHR--WVROAPGCGLEWNGWVNIIP--NSCGT
 RVH IV Consensus (1) QVQLVQSGAEVKKPKGKASVVKVSKKASGYTFGTYMHR--WVROAPGCGLEWNGWVNIIP--NSCGT
 RVH V Consensus (1) QVQLVQSGAEVKKPKGKASVVKVSKKASGYTFGTYMHR--WVROAPGCGLEWNGWVNIIP--NSCGT
 RVH VI Consensus (1) QVQLVQSGAEVKKPKGKASVVKVSKKASGYTFGTYMHR--WVROAPGCGLEWNGWVNIIP--NSCGT
 RVH VII Consensus (1) QVQLVQSGAEVKKPKGKASVVKVSKKASGYTFGTYMHR--WVROAPGCGLEWNGWVNIIP--NSCGT

CADEIA PESADA amino half

DVQLQESQPLVVKPSQSLTCTVTDYSITSDYANNWIRQFPKNKLEWNGYIS--YSGST

pos ... 10 20 30 40 50 abc

Kabat:

HH1 ...XVQLVQSGAEVKKPKGKASVVKVSKKASGYTFGTYMHR--WVROAPGCGLEWNGWVNIIP--NSCGT
 HH2 ...QVQLVQSGAEVKKPKGKASVVKVSKKASGYTFGTYMHR--WVROAPGCGLEWNGWVNIIP--NSCGT
 HH3 ...EVQLVQSGAEVKKPKGKASVVKVSKKASGYTFGTYMHR--WVROAPGCGLEWNGWVNIIP--NSCGT

Linha germinal Consenso (com JK4)

RVH I QVQLVQSGAEVKKPKGKASVVKVSKKASGYTFGTYMHR--WVROAPGCGLEWNGWVNIIP--NSCGT
 RVH II QVQLVQSGAEVKKPKGKASVVKVSKKASGYTFGTYMHR--WVROAPGCGLEWNGWVNIIP--NSCGT
 RVH III EVQLVQSGAEVKKPKGKASVVKVSKKASGYTFGTYMHR--WVROAPGCGLEWNGWVNIIP--NSCGT
 RVH IV QVQLVQSGAEVKKPKGKASVVKVSKKASGYTFGTYMHR--WVROAPGCGLEWNGWVNIIP--NSCGT
 RVH V EVQLVQSGAEVKKPKGKASVVKVSKKASGYTFGTYMHR--WVROAPGCGLEWNGWVNIIP--NSCGT
 RVH VI QVQLVQSGAEVKKPKGKASVVKVSKKASGYTFGTYMHR--WVROAPGCGLEWNGWVNIIP--NSCGT
 RVH VII QVQLVQSGAEVKKPKGKASVVKVSKKASGYTFGTYMHR--WVROAPGCGLEWNGWVNIIP--NSCGT

FIG. 24B

CADEIA PESADA carboxi half

SYNPSLKSRISITRDTSKNQFFLQLNSVTTEDTATYYCASFDYAHAM-----DYWGQGTSLVTVSS

pos ... 60 70 80 abc 90 100_abcdefghijk 110

Kabat:

HH1 ... NYAQKFGGRVTITXDXSTSTAYMELSSLRSXDTAVYYCARXXXXXXXXXXXXXXXXXXFDXWGQGTSLVTVSS
 HH2 ... XYNPSLKSRVTISVDTSKNQFSLXLXSVTAADTAVYYCARXXXXXXXXXXXXXXXXXXFDXWGQGTSLVTVSS
 HH3 ... YYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNLSLRAEDTAVYYCARXXXXXXXXXXXXXXXXXXFDXWGQGTSLVTVSS

Linha germinal Consenso (com JH4)

hVHI NYAQKFGGRVTITRDTISISTAYMELSRLESDDTAVYYCARXXXXXXXXXXXXXXXXXXVFDYWGQGTSLVTVSS
 hVHII RYSPSLKSRITITKDTSKNQVVLMTNMDPVDIATYYCAHRXXXXXXXXXXXXXXXXXXYFDYWGQGTSLVTVSS
 hVHIII YYVDSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNLSLRAEDTAVYYCARXXXXXXXXXXXXXXXXXXYFDYWGQGTSLVTVSS
 hVHIV NYNPSLKSRVTISVDKSKNQFSLKLSVTAADTAVYYCARXXXXXXXXXXXXXXXXXXYFDYWGQGTSLVTVSS
 hVHV RYSPFGQGVITISADKSISTAYLQWSSLKASDTAMYYCARXXXXXXXXXXXXXXXXXXYFDYWGQGTSLVTVSS
 hVHVI DYAVSVKSRITINPDTSKNQFSLQLNSVTPEDTAVYYCARXXXXXXXXXXXXXXXXXXYFDYWGQGTSLVTVSS
 hVHVII TYAQGFTGRFVFSLOTSTAYLQICSLKAEDTAVYYCARXXXXXXXXXXXXXXXXXXYFDYWGQGTSLVTVSS

 FIG. 24C

Numeração Kabat de 5H4

Sequência proteica da cadeia pesada de 5H4:

1-30: EIGLQSGSPE LVKFGTSVKI SCKASGYST
 31-35: GYPMH
 36-49: WVKQSHGESLEWIG
 50-65: YIS C (52A) YNGDTNY NQNFKG
 66-94: KATP TVDTSSSTAY NQF N (82A) S(82B) L(82C) TSED SAVVYCAR
 95-102: EGGNYPAY
 103-437: WGQG TLVTUSAANT TPFSVYFLAP GSAAQTNSMV
 TLGCLVKGYFPEPVTVFWNE GSLSEGVIHF PAVLQSDLYT LSSGVTVPS TWPSTVTCN
 VAHPASSTKV DKKIVPEDCG CKPCICTVPE VSSVFIFFPK PKDVLITILT PEVTCVVVDI
 SKDDPEVQFS WFDVDEVHT AQTQPREEQF NSTFRSVSEL PIMHQDWLNS KEFKCRVNSA
 AEPAPIEKTI SKYCRPKAP QVYTIFFPKK QMARDKVSILT CNITDFFPED ITVEWQWNGQ
 PAENYKNTQP IMEDTGSYFV YSKLNVQKSN WBAGNTFTCS VLHEGLNHHH TEKSLSHSPG K

Sequência proteica da cadeia leve de 5H4:

1-23: DIVMTQSHKF METSVGDRVT ITC
 24-34: KASQVIG TAVT
 35-49: WYQQKPKGQSPKLLIY
 50-56: WTSTRHA
 57-88: QVPP RFTGSGSGTD FTLTISDVQS EDLADYFC
 89-97: QQYSEYPLT
 98-214: FGAGTKLELRAD APTVSIFFP SSEQLTSGGA SVVCFLLNPFY PKDINVKWKI
 DGSEKQNGVL NWTQDQSKD STYSMSSTLT LTKDEYERHN SYTCRATHKT
 STSPIVKSPN RNEC

FIG. 24D

Numeração Kabat de MCl

Sequência proteica da cadeia pesada de MCl:

1-30: EVKLVESGGG LVQGGELKL SCATSGFTFS
 31-35: DYMY
 36-49: WVRQTPEKRLEWVA
 50-65: YIS N (#2A) GGGSTYY PRTVKG
 66-94: RFTI SRDNKNTLY LQM S (#1A) R (#2B) L (#2C) KSED TAMYCAR
 95-102: QGSGYFFAY
 103-449: WG QGTLVTVSAA KTTAPSVYPL APVCGDTGS SVTLGCLVKG YFPEFVTLW
 NSGSLSSGVH TFFAVLQSDI YTLSSSVTVT SSTWFGQGIT CNVANFASST KVDKKIEPRG
 FTIKPCPECK CPARNLGGP SVFIFPPKIK DVLMIQLSPI VTCVVDVSE DDFDQISWF
 WNNVEVHTAQ TQTHREDYNS TLRVVSALPI QHQWMSGKE FKCKVKKDL PAPIERTISK
 PKGSRAPQV YVLPPESEM TKKQVTLDM VTDMPEDIY VEWYNGKTE LNYKNTPEVL
 DEDGSYFMYG KLRVERKRWV ERNSYSCSVV HESLHHHTT KFSRTFGK

Sequência proteica da cadeia leve de MCl:

1-23: AIQMTQTTSS LSASLGRVY ISC
 24-34: SASQGIS NYLN
 35-49: WYQQK F DGTVKLLFY
 50-56: YTESLHS
 57-86: QVPS RFGSGSGTD YSLTISNLEP EDIATYYC
 89-97: QQ YSKLPWT
 98-214: FGGGTKLEIKRAD APTVEIAPP SSEQLTSGCA SVVCFLNIFY PKDINVKKI
 DGERQNGVL NSWTDQDSKE STYSMSSTLT LTKDEYERHN SYTCEATHKI STSPIVESEF
 RNEC

FIG. 24E

Numeração Kabat de MC3

Sequência proteica da cadeia pesada de MC3:

1-30: DVQLQESGPG LVKPSQSL L TCTVTGYSIT
 31-35: SDYAW N (35A)
 36-49: WIRQ FPGNKLEWMG
 50-55: YIRYSGSTSY NPQLKS
 66-94: RISIT RNTSNQFFL QL N (82A) S (82B) V (82C) TTEDT ATYYCAR
 95-102: LETWLFDY

 103-222: WGQG TFLVSSAMT TFPVSYPLAP GCGDTTGSSV TLECLVSGYF PESVTVTWNS
 GSLSSVWTF DALLQSSLYT MSSSVTVPS TWPQTVTCE VHPASSTV
 DKKLEPSGPI STINPCFPCK RCHRCFAPML EGGPSVFIFP PNIKDVLMIS
 LTFKVTQVWV DVSEDDPDVQ ISNFWNNVEV HTAQTQTHRE DYNSTIRVVS
 TLFIQHQDMM SGKEFRCKVN NKLPSPIER TISKIKGLVR APQVYILPFP
 AEQLSRKDVV LTCLVGFNP GDISVEWYEN GHTEENYKDT APVLDSEGSY
 FIYSKLNMT SKWEKTSFSS CNVRHEGLN FYLKTISR S PCLDLDEICA
 EARLGELEGL WTTITIPISL FLLSVCYSAS VILEKVKWIF SSVVELKQKI
 SPDYRNMIQ GA

Sequência proteica da cadeia leve de MC3:

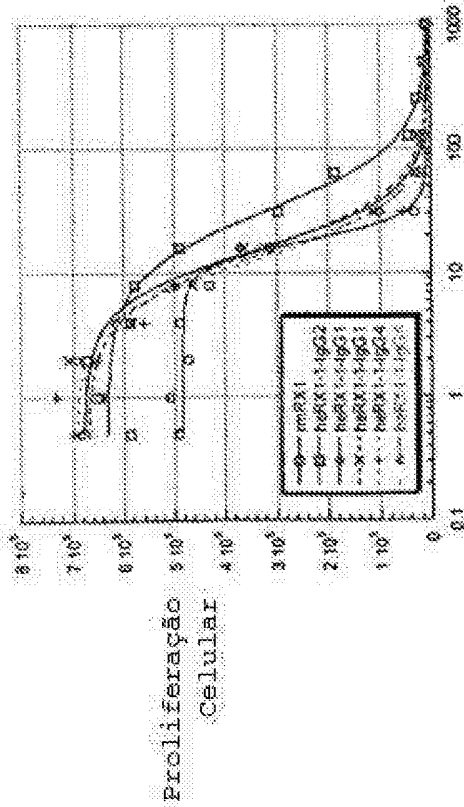
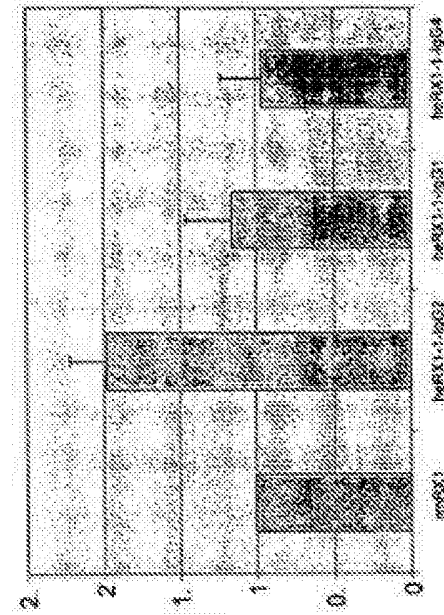
1-23: DILLTQSPAI LVSFGERVS FSC
 24-34: RASQSIG TSIN
 35-49: WYQRT NGSPELLIK
 50-56: YASESIS
 57-86: GIPS RFSGSGSOTD FTLSINSVES EDIADYYC
 87-97: QQ SNGWPTT
 98-214: FGG GTKLEIKWAD AAPTVEIFPP SSEQLTSGEA SVVCFLNIFY PEDINVKWKI
 DGSERQNGVL NSWTDQSKD STYSMSSTLT LTKDEYERNH SYTCEATHKT
 STSPIVKSFN RNEC

FIG. 25

Medição da Atividade Neutralizante de herX1-1 com diferentes regiões constantes de subclasses de Igg

Atividade neutralizante de séries de herX1-1

Atividade neutralizante de herX1-1 com constante humana



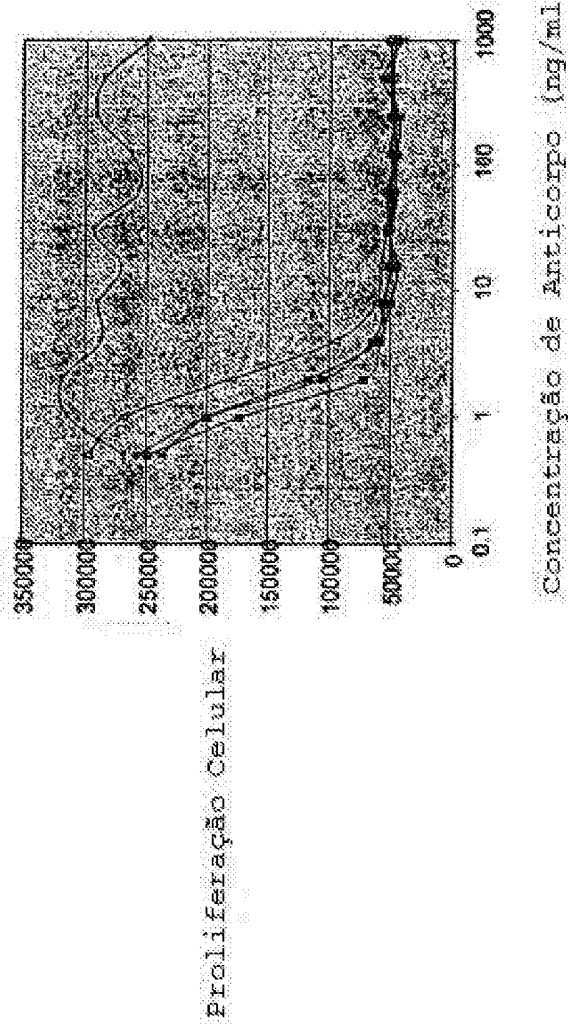
Contra MCSF recombinante humana

Contra MCSF recombinante humana

FIG. 26

Atividade de herX1-1 com diferentes subclasses de IgG contra outras formas de MCSF

Atividade neutralizante contra soro humano



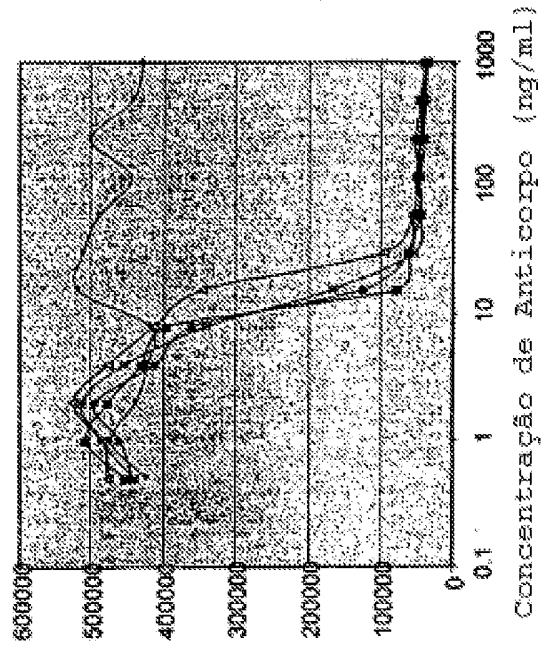
Resultados semelhantes observados contra Cyno MCSF em soro e Cyno MCSF recombinante

FIG. 27

Atividade de herX1-1 com diferentes subclasses de IgG contra outras formas de MCSF

Atividade neutralizante contra MDA231 CM

Proliferação Celular

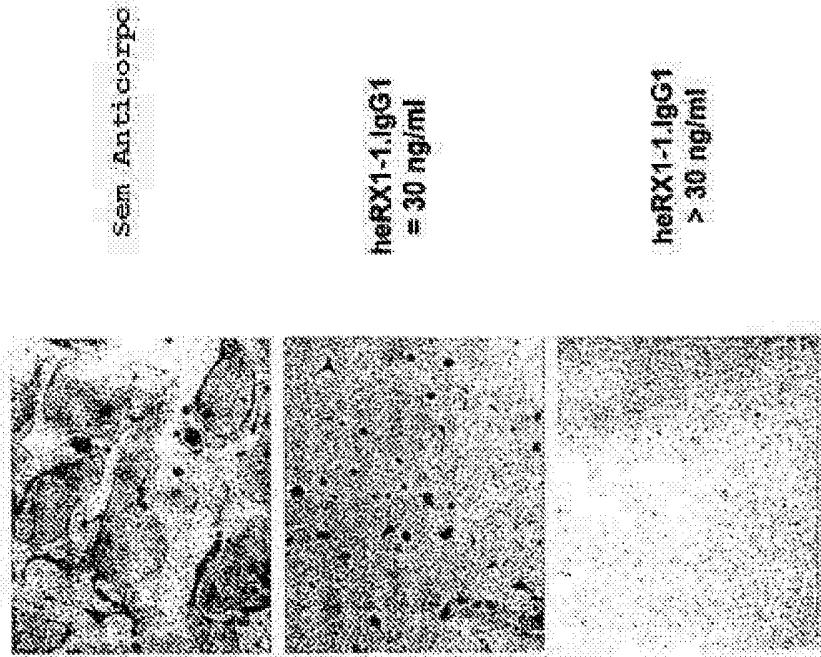
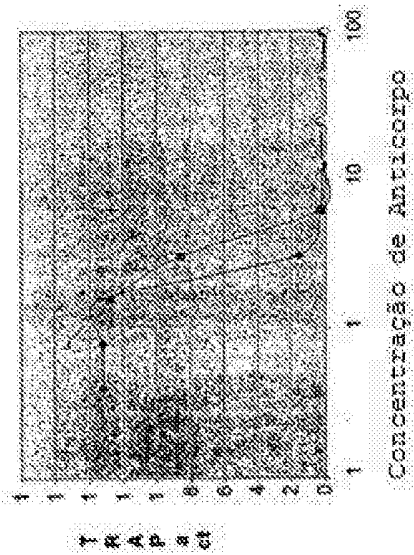


—●— mRX1 —○— RX1-1-IgG2 —*— RX1-1-IgG1 —◆— RX1-1-IgG4 —■— RX2

FIG. 28

Ensaio de Osteoclastogênese de heRX1-1 com diferentes subclasses de IgG

Atividade de TRAP em meio condicionado no ensaio de osteoclastogênese



heRX1-1.IgG1
rmRX1
heRX1-1.IgG2

Aminoácidos

MGWSCILFLVATATGVHS

DVQLQESGPGLVKPSQTLSTCTVTDYSITSDYA WNWIKQFFGKLEW MGVISYSGTSYNP SLKSRITISRDT SKNQFSL
QLNSVTAADTATYYCASFDYAHAMDYWGQQTTFVTVSS

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVEDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSQLYSLSSVTVFPSSSLGTQTY
ICNVNHIKPSNTKVDKREVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVYVDVSHEDPEVKFNWY
YDGVVFNHIAKTKPREEQYNSTYR VYVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEK TISKAKGQPREPQVYTLPPSREE
MTFNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYK TTPFVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFPSCSYMHEALHNH
YTKQSLSLSPGK*

Nucleótidos

ATGGGATGGAGTTGCATTACTTTTCTCGTTGCCACCGCCACTGGAGTTCACTCTGACGTACAACCTCAAGAATC
TGGCCAGGTCCTCGTEAAAACCTTCTCAAACCTCTCTCACTCACCTGCACTGTTACTGACTACTCTATTACATCCGACTA
CGCTTGGAACTGGATECCGACAAATTTCTGGTAAAAAACTCGAATGGATGGGTATATTTCTTACTCTGGCTCCACCT
CCTACAATCCTTCTCTGAAATCACGCATCACAAATTTCCCGGATACCTCTAAAAATCAATTTCACTCCAACTCAAT
CTGTTACCGCCCGGATACTGCCACTACTACTGTGCTCTTTTGACTACGCTCAOGCCATGGATTATTGGGGACAG
GGTACTACCGTACCCTAAGCTCAGCCAGCACAAAGGGCCCATGGGTCTTCCCCCTGGCACCCCTCTCCAAGAGCA
CCTCTGGGGGCACAGCCGGCCCTGGGCTGCTGGTCAAGGACTACTTCCCGGAACCGGTGACGGTGTCTGTGGAAC
AGGCGCCTGACCAGCGCCGTCACACCTTCCCGGCTGTCTACAGTCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAACCGTGG
TGACCGTGCCTCCAGCAGCTTGGCAECCAGACTACATCTGCAACGTGAATCACAAGCCCAAGCAACACCAAGGT
GGACAAGAGAGTTGAGCCCAAATCTTGTGACAAAACCTCACACATGTCCACCGTGCCAGCACTGAACTCCTGGGG
GGACCGTCAGTCTTCTCTTCCCCCAAACCCAAAGGACACCCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGGTCACATGGGT
GGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCCTGAAGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGC
CAAGACAAAGCCCGCGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGGGTCTCACCCTCCTGACCCAGGA
CTGGCTGAAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCAGCCCCCATGAGAAAACCATCTCC
AAAGCCAAAGGGCAGCCCGGAGAACACAGGTGTACACCTGCCCCCATCCCGGGAGGAGATGACCAAGAACCCAG
GTCAAGCTGACCTGGCTGGTCAAAGGCTTCTATCCAGCCACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGCCAGCCGG
AGAACAACTACAAGACCACGCCCTCCCGTGGACTCCGACCGCTCCTTCTTCTCTATAGCAAGCTCACCGTGGAC
AAGAGCAGGTGGCAGCAAGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCAATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGA
AGAGCCTCTCCCTGTCCCGGGTAAATGA

Aminoácidos

MGWSCIHLFLVATATGVHS

QVQLQESGPGLVKPSQTLSTCTVSDYSITSDYAWNWIQFFGKGLEWVWGYISYSGSTSYNPSLKSRTISRDTSKNQFSL
QLNSVTAADTAVYYCASFDYAHAMDYWGQGTITVTVSS

ASTKGPSVFFLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVYVSWNSGALTSQVHTFPAVLQSSQLYSLSSVTVTPSSSLGTQTY
ICHVNHKPSNTRVDKRVEPKSCDKHTHTCPCPAPELGGPSVFLFPPKPKDTLMISKRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWY
VDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYVTLPPSREE
MTRNQVSLTCLVKGFVPSDIAVEWESNGQPENNYETTPPVLDSDGFFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSSVMHEALHNNH
YTQKSLSLSPGK*

Nucleótidos

ATGGGTTGGTCTTGCATCATTTCTCTTTCTGGTCCCTACCGCAACTGGTGTACACTCCCAAAGTTCAACTTCAAGAATCA
GGCCCCGGACTGGTTAAACCCCTCTCAAACCTCTCTCTTACTTGCCTGTATCCGATTAATCTTAATCTCAGACTAC
GCTTGGAACTGGATCAGACAATTTCCCGGAAAAGGACTGGAAATGGATGGGATATATCTCTTACTCTGGCTCAACCT
CTTACAACCCCTCTCTCAAATCTCGAATAACAATCTCACGCGGATACTTCTAAAAATCAATTTCTCACTCAACTTAAC
TCCGTTACTGCCCGGACACTGCCGTTTACTACTGTGCTTCTTCCGATTAAGGCCAGCCTATGGATTAATGGGGACA
AGGAACTACCGTCACTGTCAGCTCAGCCAGCACAAGGGGCCATGGGTCTTCCCGCTGGCACCCCTCTCCAAGAGC
ACCTCTGGGGGCAAGCCGCCCTGGGCTGCTGTCAAGGACTACTTCCCGAACCCTGACGGGTGTCTGGAACT
CAGCGCCCTGACCAGCGGGCTGCAACCTTCCCGGCTGTCTACAGTCCCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTG
GTGACCGTGCCTCCAGCAGCTTGGGCAACCAGACCTACATCTGCAACGGTGAATCACAAGCCCAGCAACACCAAGG
TGGACAAGAGAGTTGAGCCCAAATCTTGTGACAAAACCTCACACATGTCCACCGTGGCCAGCACTGAACCTCTGGG
GGGACCGTCACTCTTCTCTTCCCGCCAAAACCAAGGACACCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTACATGCG
TGGTGGTGGAGCTGAGCCACGAAGACCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATG
CCAAGACAAAAGCCCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACCTACCCGTGTGGTCAAGCTCCTCACCGTCTCACCAAGG
ACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCAGCCCCATCGAGAAAACCATCTC
CAAAGCCAAAAGGGCAGCCCGGAGAACACAGGTGTACAACCTGCCCCCATCCCGGGAGGAGATGACCAAGAACCA
GGTCAAGCTGACTGCTGGTCAAAGGCTTCTATCCAGCGACATCCCGGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCG
GAGAACAACACAAAGAACAGCCCTCCCGTCTGGACTCCGACCGCTCTCTTCTCTATAGCAAAGCTCACCGTGG
ACAAGAGCAAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAAACACTACAGCA
GAAGAGCCTCTCCCTGTCCCGGGTAAATGA

FIG. 30

HeRX-1 Cadeia pesada Gamma 4 de baixo risco

Aminoácidos

MGWNSCHL²EVATQGVHSVQLQESGFLVKFSQTL¹SLTCTVYTDYSITSDYA¹WNWIRQFPQKLEW¹MGYISYSGT¹SYN¹
 PSLKSRITISRDTSKNQFSLQNSVTAADTATYYCASFDYAHAMDYWGQ¹TTVTVSSASTKQSPVFLAPCSRSTSESTA¹
 ALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALISG¹VHTTFAVLOSSGLYSLSSVYTVFSSSLOTKT¹YTCNV¹DHKPENTK¹VDKRVESKY¹
 GPPCPSPAPEFLGGPSVFLPPPKD¹TL¹MISRTPEVTCVYVDYSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTEPREBQFNSTYRV¹
 VSVLTVLHQDWLNQKEYKCKVSNKGLPSSIEK¹TISKAKGQPREPQVYTLFPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEW¹
 ESNQOPE¹ENYKTTTPVLDSDGSSFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHREALHNNHYTKLSLSL¹GLK

Nucleótidos

cDNA

ATGGGATGGAGTTGCATTATACTTTTCCCTCGTTGCCACC¹GGCACTGGAGTTCACTCTGACGTACAACTTCAAGAATC¹
 TGGCCCAGGTCTCGTCAAACCTTCTCAAACCTCTCTCACTCACCTGCCACTGTTACTGACTACTCTATTACATCCGACTA¹
 CGCTTGGAACTGGATCCGACAATTTCCCTGGTAAAAAACTCGAATGGATGGGTTATAATTTCTTACTCTGGCTCCACCT¹
 CCTACAATCCTTCTCTGAAATCAGGCATCACAATTTCCCGCGATACTCTTAAAAATCAATTTTCACTCCAACCTCAATT¹
 CTGTTACCGCCCGCGATACTGCCACCTACTACTGTGCCTCTTTTGACTACGCTCACGCCATGGATTATTGGGGACAG¹
 GGTACTACCGTTACCGTAAGCTCAGCCAGCACAAAGGGCCATCCGTTCTTCCCTCGCCCTGCTCCAGGAGCA¹
 CCTCCGAGAGCACAGCCCGCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCGGAACCGGTGACGGTGTGGTGGAACTC¹
 AGGCGCCCTGACCAAGCCGCTGCACACCTTCCCGGCTGTCTACAGTCTCAAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGG¹
 TGACCGTGGCCCTCCAGCAGCTTGGCCACGAAGACCTACACCTCCAAAGTAGATCACAAGCCAGCAACACCAAGGT¹
 GGACAAGAGAGTTGAGTCCAAATATGGTCCCCCATGCCCATCATGCCCAGGACCTGAGTTCTTGGGGGACCATCA¹
 GTTCTCTGTTCCCCCAAAACCCAAGGACACTCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCAAGTGGTGGTGGTGG¹
 CDTGAGCCAGGAAGACCCCGAGGTCCAGTTCAACTGGTAGGTGGATGGCGTGGAGGTGCAATAATGCCAAGACAAA¹
 GCCCGGGAGGAGCAGTTCAACAGCAAGTACCGTGTGGTCAAGCGTCTCACCCTGCTGCCACCCAGGACTGGCTGAAAC¹
 GGCAAGGAGTACAAGTGCAGGTCTCCAAACAAGGCTCCCGTCTCCATGGAGAAAAACAATCTCCAAAAGCCAAA¹
 GGGCAGCCCGGAGAGCCACAGGTGTACACCTGCCCCCATCCCAAGGAGGAGATGACCAAGAACAGGTCAAGCTG¹
 ACCTGCCCTGTTCAAAGGCTTCTACCCAGGACATCCCGGTGGAGTGGGAGAGCAATGGCCAGCCGGAGAAACAAC¹
 TACAAGACCACGCTCCCGTCTGGACTGGGACGGCTCCTCTTCTCTTACAGCAGGCTAACCGTGGACAAGAGCA¹
 GGTGGCAGGAGGGAAATGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCCACAACCACTACACACAGAAAGAGCCT¹
 CTCCTGTCTCTGGTAAATGA

Genômico

ATGGGATGGAGTTGCATTATACTTTTCCCTCGTTGCCACC¹GGCACTGGAGTTCACTCTGACGTACAACTTCAAGAATC¹
 TGGCCCAGGTCTCGTCAAACCTTCTCAAACCTCTCTCACTCACCTGCCACTGTTACTGACTACTCTATTACATCCGACTA¹
 CGCTTGGAACTGGATCCGACAATTTCCCTGGTAAAAAACTCGAATGGATGGGTTATAATTTCTTACTCTGGCTCCACCT¹
 CCTACAATCCTTCTCTGAAATCAGGCATCACAATTTCCCGCGATACTCTTAAAAATCAATTTTCACTCCAACCTCAATT¹
 CTGTTACCGCCCGCGATACTGCCACCTACTACTGTGCCTCTTTTGACTACGCTCACGCCATGGATTATTGGGGACAG¹
 GGTACTACCGTTACCGTAAGCTCAGCCAGCACAAAGGGCCATCCGTTCTTCCCTCGCCCTGCTCCAGGAGCA¹
 CCTCCGAGAGCACAGCCCGCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCGGAACCGGTGACGGTGTGGTGGAACTC¹
 AGGCGCCCTGACCAAGCCGCTGCACACCTTCCCGGCTGTCTACAGTCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGG¹
 TGACCGTGGCCCTCCAGCAGCTTGGCCACGAAGACCTACACCTGCCAACGTAGATCACAAGCCAGCAACACCAAGGT¹
 GGACAAGAGAGTTGGTGGAGAGCCAGCACAGGGAAGGAGGGTGTCTCTGGAAAGCCAGGCTCAGGCTCAGGCTGCT¹
 GGACGCAACCCCGCTGTCCAGCCCCAGCCAGGGCAGCAAGGCATGCCCATCTGTCTCTCAACCCGGAGGCTCT¹
 GACCAACCCACTCATGCTCAGGGAGAGGGTCTTCTGGATTTTCCACCAAGGCTCCGGGACGCCACAGGCTGGATGC¹
 CCTACCCAGGCCCTGCCGATACAGGGGAGGTTGCTGCTCAGACCTGCCAAGAGCCAATCCGGGAGGACCT¹
 GCCCCTGACCTAAGCCCAACCCAAAGGCCAAACTCTCCACTCCCTCAGGCTCAGACACTTCTCTCCTCCACAGATCT¹
 AGTAACTCCCAATCTTCTCTGCAAGTCCAAATATGGTCCCCCATGCCCATCATGCCCAGGTAAGCCAAGCCAGG¹
 CCTCCGCTCCAGCTCAAGGCGGGACAGGTGCCCTAGAGTAGCCTGCATCCAGGGACAGGCCCAAGCCAGGCTGCTG¹
 ACCATCCACCTCCATCTCTTCTCAGCACTGAGTCTCTGGGGGACCAATCAGTCTTCTGTTCCCCCAAAACCC¹
 AAGGACACTCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCAAGTCAAGTGGTGGTGGTGGACGTGAGCCAGGAAGACCCGAGG¹
 TCCAGTTCAACTGGTACGTGGATGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCCGGGAGGAGCAAGTTCAACA¹
 GCACGTACCGTGTGGTCAAGCTCTCAGGCTCCTGCACCGTCCCTGCACCAAGGACTGCTGAAACCGCAAGGAGTACAAGTCAAGGT¹
 CTCCAACAAAAGCCCTCCGCTCTCCATCCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGTGGGACCCAGGCTCCGAGG¹
 GCCACATGGACAGAGGTCAGCTGGGCCACCCCTCTGCCCTGGGAGTGACCGCTGTGCCAACCTCTGTCCCTACAGG¹
 GCAGCCCGGAGAGCCACAGGTGTACACCTGCCCCCATCCAGGAGGAGATGACCAAGAACAGGTCAAGCTGAC¹
 CTGCTGGTCAAAGGCTTCTACCCAGGACATGCCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGCCAGCCGGAGAACAACTA¹
 CAAGACAGGCTCCCGTCTGGACTCCGACCGCTCCTTCTTCTCTACAGCAGGCTAACCGTGGACAAGAGCAGG¹
 TGGCAGGAGGGAAATGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCCACAACCACTACACACAGAAAGAGCCT¹
 CCTGTCTCTGGTAAATGA