



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

(21) **PI0707824-2 A2**

(22) Data de Depósito: 15/02/2007
(43) Data da Publicação: 10/05/2011
(RPI 2105)



* B R P I 0 7 0 7 8 2 4 A 2 *

(51) *Int.Cl.:*
A61K 39/00
A61K 39/395
C12P 21/08

(54) Título: **PROTEÍNA DE LIGAÇÃO A ANTÍGENO, E, MÉTODOS DE NEUTRALIZAÇÃO DA ATIVAÇÃO DE UM RECEPTOR DE TIROSINA QUINASE, DE INIBIÇÃO DE ANGIOGÊNESE, DE REDUÇÃO DE CRESCIMENTO DE TUMOR E DE PRODUÇÃO DE UMA PROTEÍNA DE LIGAÇÃO A ANTÍGENO**

(30) Prioridade Unionista: 15/02/2006 US 60/773994

(73) Titular(es): Imclone Systems Incorporated

(72) Inventor(es): Zhenping Zhu

(74) Procurador(es): Momsen, Leonardos & CIA.

(86) Pedido Internacional: PCT US2007004051 de 15/02/2007

(87) Publicação Internacional: WO 2007/095338 de 23/08/2007

(57) Resumo: PROTEINA DE LIGAÇÃO A ANTÍGENO, E, MÉTODOS DE NEUTRALIZAÇÃO DA ATIVAÇÃO DE UM RECEPTOR DE TIROSINA QUINASE, DE INIBIÇÃO DE ANGIOGÊNESE, DE REDUÇÃO DE CRESCIMENTO DE TUMOR E DE PRODUÇÃO DE UMA PROTEÍNA DE LIGAÇÃO A ANTÍGENO A invenção é dirigida a novos anticorpos que compreende sítios de ligação de domínio único. Os anticorpos podem ser bivalentes ou multivalentes, e podem ser biespecíficos. A invenção é ainda dirigida a anticorpos monoespecíficos e biespecíficos, que ligam a mPDGFR α . Os anticorpos podem ser administrados sozinhos ou em combinação com drogas antiangiogênicas ou antineoplásicas.

“PROTEÍNA DE LIGAÇÃO A ANTÍGENO, E, MÉTODOS DE NEUTRALIZAÇÃO DA ATIVAÇÃO DE UM RECEPTOR DE TIROSINA QUINASE, DE INIBIÇÃO DE ANGIOGÊNESE, DE REDUÇÃO DE CRESCIMENTO DE TUMOR E DE PRODUÇÃO DE UMA PROTEÍNA DE LIGAÇÃO A ANTÍGENO”

REFERÊNCIA CRUZADA A PEDIDOS RELACIONADOS

Este pedido reivindica prioridade para pedido US 60/773.994, depositado em 15 de fevereiro de 2006, que é aqui incorporado por referência em sua totalidade.

10 CAMPO DA INVENÇÃO

A presente invenção é dirigida a novos anticorpos, que compreendem sítios de ligação a domínio único. Os anticorpos podem ser bivalentes ou multivalentes, e podem ser específicos ou multiespecíficos. Também são descritos anticorpos biespecíficos e multiespecíficos que ligam a 15 proteínas de receptor de superfície. Quando administrados a um indivíduo sozinhos ou em combinação com fármacos angiogênicos ou antineoplásicos, os anticorpos podem ser usados para inibir o crescimento de tumores bem como inibir as doenças hiperproliferativas.

ANTECEDENTES

20 Anticorpos biespecíficos (BsAb) são moléculas baseadas em imunoglobulina (Ig) que ligam a dois epítopos diferentes nos mesmos ou em antígenos distintos. Tanto os estudos de laboratório como clínicos recentes demonstram que BsAb pode ter aplicações significativas em terapia de câncer, por exemplo marcando no alvo as células de tumor com agentes 25 citotóxicos como células efectoras, radionuclídeos, fármacos e toxinas (Weiner et al., 1997, Cancer Immunol. Immunother. 45: 190-2; van Spriël et al., 2000, Immunol. Today 21: 391-7; Segal et al., 2000, J. Immunol. Methods 248: 1-6), ou marcando simultaneamente dois alvos de tumor diferentes (ou epítopos) a fim de melhorar as atividades biológicas de terapêuticos de

anticorpos individuais (Lu et al., 1999, *J. Immunol. Methods* 230: 159-71; Lu et al., 2001, *Cancer Res.* 61: 7002-8; Lu et al., 2002, *J. Immunol. Methods* 267: 213-26). Um obstáculo principal no desenvolvimento de agentes terapêuticos com base em BsAb é a dificuldade em produzir os materiais com
5 qualidade e quantidade suficientes para estudos clínicos via métodos tradicionais, incluindo hibridoma híbrido e conjugação química (Carter et al., 1995, *J. Hemotherapy* 4: 463-70). A co-expressão de dois conjuntos diferentes de cadeias leves e pesadas de IgG pode resultar em uma variedade de pares de cadeias leves e pesadas, somente um dos quais é o heterodímero
10 biespecífico funcional desejado (Suresh et al., 1986, *Methods Enzymol.* 121: 210-28). Por outro lado, a reticulação química de dois IgGs ou seus fragmentos é com frequência ineficiente e pode levar à perda de atividade do anticorpo (Zhu et al., 1994, *Cancer Lett.* 86: 127-34). Em ambos os métodos, a purificação de BsAb de espécies não naturais, como homodímeros e
15 heterodímeros com pares errados de cadeias leves e pesadas de Ig não cognatas produzidos pelo hibridoma híbrido, e agregados multiméricos resultantes de conjugação química, é com frequência difícil e o rendimento é geralmente baixo (Cao et al., 1998, *Bioconj. Chem.* 9: 635-44).

Para melhorar a eficiência, vários métodos recombinantes
20 foram desenvolvidos para a produção de BsAb, tanto como fragmentos de anticorpos (Carter et al., 1995; Pluckthun et al., 1997, *Immunotechnology* 3: 83-105; Todorovska et al., 2001, *J. Immunol. Methods* 248: 47-66) como formatos de IgG de comprimento completo (Carter, 2001, *J. Immunol. Methods* 248: 7-15). Por exemplo, a produção de BsAb de tipo de IgG de
25 comprimento completo, homogênea, é obtida pela assim chamada engenharia de “nós-em-furos” para a heterodimerização eficiente do domínio C_{H3} (Ridgway et al., 1996, *Protein Eng.* 9: 617-21; Merchant et al., 1998, *Nat. Biotech.* 16: 677-81) e fusionando dois Fv de cadeia única (scFv) de especificidades diferentes em qualquer um dos terminos N ou C de uma

molécula de IgG de comprimento completo (Zhuang et al., 2000, Protein Eng. 13: 361-7; Coloma e Morrison, 1997, Nat. Biotechnol. 15: 159-63). Os BsAbs também são construídos fusionando geneticamente Fv de cadeia única (scFv) ou fragmentos Fab com ou sem o uso de ligadores flexíveis (Mallender et al., 5 1994, J. Biol. Chem. 269: 199-206; Mack et al., 1995. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 92: 7021-5; Zapata et al., 1995, Protein Eng. 8: 1057-62), via um dispositivo de dimerização como *zipper* de leucina (Kostelny et al., 1992, J. Immunol. 148: 1547-53; de Kruif et al., 1996, J. Biol. Chem. 271: 7630-4), e domínios CL/CH1 de Ig (Muller et al., 1998, FEBS Lett. 422: 259-64); por 10 diacorpo (Holliger et al., 1993, Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 90: 6444-8; Zhu et al., 1996, Bio/Technology (NY) 14: 192-6); fusão Fab-scFv (Lu et al., 2002; Schoonjans et al., 2000, J. Immunol. 165: 7050-7); e formatos de mini-anticorpos (Pack et al., 1992, Biochemistry 31: 1579-84; Pack et al., 1993, Bio/Technology 11: 1271-7). Na maioria dos casos, estas abordagens 15 recombinantes resultam na produção de moléculas de anticorpos biespecíficos divalentes que são monovalentes em cada um dos antígenos alvo. Além disso, os exemplos de anticorpos biespecíficos de tipo de a IgG compreendendo domínios Fc funcionais são limitados.

SUMÁRIO DA INVENÇÃO

20 A invenção provê novos anticorpos biespecíficos que compreendem sítios de ligação a antígeno de domínio variável único (sVD). Os anticorpos da invenção também podem incluir sítios de ligação a antígeno que compreendem sítios de ligação a anticorpos Fvs além de sítios de ligação a antígenos VD.

25 Anticorpos da invenção podem ser específicos para qualquer antígeno. Em uma forma de realização, um anticorpo da invenção liga-se a um antígeno de superfície de célula, que pode ser um receptor tirosina quinase (incluindo, mas não limitado a PDGFR, VEGFR1, VEGFR2, EGFR). Em uma outra forma de realização, um anticorpo da invenção liga um ligando de

um receptor de superfície de célula. Em uma forma de realização preferida, um anticorpo da invenção tem atividade de neutralização de receptor. A invenção ainda provê composições farmacêuticas dos anticorpos.

5 A presente invenção provê métodos para a inibição da ativação de um ou mais receptores tirosina quinases. O crescimento de tumor em um mamífero pode ser tratado ou inibido administrando-se ao mamífero uma quantidade eficaz de um anticorpo presente. Os anticorpos presentes podem ser co-administrados com anticorpos que se ligam a outro antígeno de superfície de célula (incluindo, por exemplo, RTKs) ou citoquinas (incluindo, 10 por exemplo, ligandos de RTK). Em determinadas formas de realização, os métodos também compreendem a administração ao mamífero de um agente antineoplásico ou tratamento, incluindo, por exemplo, um agente quimioterapêutico e/ou radiação. Em uma outra forma de realização, a invenção provê um método para o tratamento de uma doença 15 hiperproliferativa não câncer, por exemplo, psoríase, em um mamífero.

BREVE DESCRIÇÃO DAS FIGURAS

A figura 1 é um diagrama esquemático mostrando exemplos de proteínas de ligação a antígeno biespecíficas baseadas em anticorpo de domínio único da invenção. O domínio único (designado V_{H2} no desenho) 20 pode ser incorporado por fusão aos término N ou término C de outros domínios de anticorpos.

A figura 2 mostra a expressão e purificação de Fabs específicos de mPDGFR α . Os Fabs foram expressados em células HB2151 hospedeiras de *E. coli*, purificados por cromatografia de afinidade e 25 analisados por SDS-PAGE. A) Fabs específicos de mPDGFR α “padrão” tendo cadeias pesadas (V_H-C_{H1}) e leves (V_L-C_L) de peso molecular similar. B) Fragmentos de Fab 1F2 e 1F9 faltando domínios V_L e um controle de Fab padrão na presença ou ausência de DTT. Os marcadores de peso molecular são expressos em kilodaltons.

A figura 3 mostra testes de ligação e de bloqueio de Fabs purificados. A) ELISA de ligação quantitativo de Fabs purificados em PDGFR α de murino. Várias quantidades de Fabs foram primeiro incubadas em uma placa de 96 cavidades pré-revestida com proteína de fusão mPDGFR α -Fc seguido por incubação com um conjugado de anticorpo - HRP anti-anti-humano- κ de coelho. Anticorpo - HRP ligado à placa foi quantificado pela adição de substrato de peroxidase, e a absorbância foi lida a 4450 nm. B) Inibição da ligação de mPDGFR α a PDGF-AA imobilizado por Fabs purificados. Várias quantidades de Fabs foram incubadas com uma quantidade fixa de mPDGFR α /Fc em solução. As misturas foram incubadas em placas de 96 cavidades revestidas com PDGF-AA seguido pelo conjugado anticorpo-HRP anti-humano-Fc. mPDGFR α ligado foi então quantificado pela adição de substrato de peroxidase, e a absorbância foi lida a 4450 nm. Os dados mostrados representam a média \pm desvio padrão de amostras em duplicata.

A figura 4 descreve estruturas de Fabs monovalentes e bivalentes da invenção.

A figura 5 mostra a expressão e purificação de Fabs específicos de mPDGFR α bivalentes. Os Fabs foram expressados em células HB2151 hospedeiras de *E. Coli*, purificadas por cromatografia de afinidade, e analisadas por SDS-PAGE. Fab 1F2-2H bivalente é comparado com um Fab padrão (5C5) em condições não redutoras. Os marcadores de peso molecular são expressos em kilodaltons.

A figura 6 mostra testes de ligação e de bloqueio de anticorpos purificados. A) Teste de ligação quantitativo de anticorpos Fab IF2 monovalentes e bivalentes anti- mPDGFR α purificados. Várias quantidades de anticorpos foram incubadas em uma placa de 96 cavidades pré-revestida com mPDGFR α /Fc, seguido por incubação com um conjugado anticorpo-HRP anti-humano- κ . O Anticorpo - HRP ligado à placa foi então quantificado

pela adição de substrato de peroxidase, e a absorbância foi lida a 4450 nm. B) Inibição da ligação de mPDGFR α a PDGF-AA immobilizado pelos anticorpos Fabs purificados. Várias quantidades de anticorpos foram incubadas com uma quantidade fixa de mPDGFR α /Fc e as misturas foram transferidas para placas pré-revestidas com PDGF-AA. Após lavagem, as placas foram então incubadas com um conjugado anticorpo-HRP anti-humano-Fc. mPDGFR α ligado foi quantificado pela adição de substrato de peroxidase, e a absorbância foi lida a 4450 nm. Os dados mostrados representam a média \pm desvio padrão de amostras em duplicata. 2B4 é um anticorpo dirigido contra VEGFR2 de camundongo (Flk1).

A figura 7 provê uma representação esquemática de IgGs de comprimento completo com base em IF2. O V_H de IF2 é expressado como uma proteína de fusão em CL e/ou CH, provendo anticorpos tetravalentes (painel A; MW ~ 150.000) ou bivalentes (painéis B e C: MW ~ 125.000).

A figura 8 mostra a expressão e purificação de anticorpos anti-mPDGFR α . No painel à direita, os anticorpos foram tratados com DTT antes de eletroforese.

A figura 9 mostra testes de ligação e de bloqueio de ligandos para anticorpos purificados. A) ligação quantitativa, anticorpos anti-mPDGFR α purificados. Várias quantidades de anticorpos foram incubadas em uma placa de 96 cavidades pré-revestida com mPDGFR α /Fc, seguido por incubação com um conjugado anticorpo-HRP anti-humano- κ . O anticorpo HRP ligado à placa foi quantificado pela adição de substrato de peroxidase, e a absorbância foi lida a 4450 nm. B) Inibição da ligação de mPDGFR α a PDGF-AA immobilizado pelos anticorpos purificados. Várias quantidades de anticorpos foram incubadas com uma quantidade fixa de mPDGFR α /Fc e transferidas para placas pré-revestidas com PDGF-AA. As placas foram lavadas e incubadas com um conjugado anticorpo-HRP anti-humano-Fc. mPDGFR α ligado foi então quantificado pela adição de substrato de

peroxidase, e a absorbância foi lida a 4450 nm. Os dados representam a média \pm desvio padrão de amostras em duplicata. 2B4 é um anticorpo dirigido contra VEGFR2 de camundongo (Flk1).

A figura 10 provê uma representação esquemática de anticorpos biespecíficos tetravalentes com base em IF2 selecionados que ligam mPDGFR α e flk-1. A) Anticorpo de tipo IgG designado IF2/scFv2B4. V_H de IF2 é expressado como uma fusão a C_L, e 2B4 é expressado como uma fusão de scFv a C_H. B) O anticorpo de tipo IgG designado IF2-2B4. V_H de IF2 é expressado como uma fusão ao término amino de V_L de 2B4.

A figura 11 mostra a expressão e purificação de anticorpos biespecíficos com base em IF2. Os anticorpos foram expressados em células de mamífero, purificados por cromatografia de afinidade, e analisados por SDS-PAGE. Os anticorpos foram tratados com/sem (\pm) DTT antes de eletroforese. Os marcadores de peso molecular são expressos em kilodaltons.

A figura 12 mostra os testes de ligação quantitativos de anticorpos biespecíficos anti- mPDGFR α x anti-Flk-1. A) Várias quantidades de anticorpos foram primeiro incubadas em uma placa de 96 cavidades pré-revestida com mPDGFR α /Fc, seguido por incubação com um conjugado anticorpo-HRP anti-humano- κ . B) Várias quantidades de anticorpos foram primeiro incubadas em uma placa de 96 cavidades pré-revestidas com Flk-1/Fc, seguido por incubação com um conjugado anticorpo-HRP anti-humano- κ . Os dados mostrados representam a média \pm desvio padrão de amostras em duplicata.

A figura 13 mostra testes de bloqueio de anticorpos biespecíficos anti- mPDGFR α x anti-Flk-1. A) Inibição da ligação de mPDGFR α a PDGF-AA imobilizado pelos anticorpos biespecíficos purificados. B) Inibição da ligação de Flk-1 a VEGF165 imobilizado pelos anticorpos biespecíficos purificados. Em ambos os testes, várias quantidades de anticorpos foram incubadas com uma quantidade fixa de receptor

(mPDGFR α /Fc ou Flk-1) em solução e transferidas para placas pré-revestidas com ligando (PDGF-AA ou VEGF165). As placas foram então incubadas com um conjugado anticorpo-HRP anti-humano-Fc. mPDGFR α ligado foi então quantificado pela adição de substrato de peroxidase, e a absorbância foi lida a 4450 nm. Os dados mostrados representam a média \pm desvio padrão de amostras em duplicata.

A figura 14 mostra inibição da fosforilação de receptor estimulada por PDGF e VEGF pelo IF2-2B4IgG biespecífico. Células eEnd.1 foram primeiro incubadas com vários anticorpos a 37 °C durante 30 min, seguido por estímulo com VEGF ou PDGF a 37 °C durante 15 min. Após lise de células, os receptores foram imunoprecipitados a partir do sobrenadante de lisado de células por incubação com um anticorpo anti- mPDGFR α ou um anti-mVEGFR2, seguido por pérolas de ProA/G Sepharose . As proteínas de receptor precipitadas foram resolvidas em um gel Nupage Bis-Tri 4-12% e transferidas para uma membrana de difluoreto de polivinilideno. Fosfo-mVEGFR2 e fosfo- mPDGFR α foram detectados no blot usando um conjugado anticorpo - HRP anti-fosfo-tirosina. As proteínas de receptor totais carregadas no gel foram testadas com anticorpos em mPDGFR α ou mVEGFR2.

A figura 15 mostra as seqüências de aminoácidos dos domínios V_H e V_L de várias proteínas de Fab identificadas. Fabs 1E10, 1^A11, 3B2, 1C10, 3G7, 1F9 e IF2 foram identificados em uma triagem para o fago Fab que liga a PDGFR α de murino. Fab 2B4 foi identificado em uma triagem para fago de Fab que liga a VEGFR2 de murino; mutação com deslocamento de armação; * códon de parada resultante de mutação com deslocamento de armação; @...@: deleção em armação.

DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO

A invenção provê novos anticorpos que compreendem sítios de ligação a antígeno de domínio variável único (sVD). A invenção também

provê proteínas de ligação a antígeno que compreendem tanto os sítios de ligação a antígeno de domínio único, como os sítios de ligação a antígeno de tipo Fv de dois domínios.

Sítios de ligação a antígeno de domínio único são similares a domínios variáveis de imunoglobulina (por exemplo, V_H ou V_L), mas são capazes de ligação específica a antígeno na ausência de um segundo domínio de ligação a antígeno (por exemplo, uma contraparte V_L ou V_H). Os domínios únicos podem de fato ser incapazes de associação estável com a contraparte de domínios de ligação. No entanto, anticorpos de domínio único podem ligar antígeno com afinidades e avides similares às de anticorpos que incluem ambos os domínios V_L e V_H . Além disso, como anticorpos naturais, anticorpos de domínio único podem bloquear as interações receptor-ligando. Conseqüentemente, os anticorpos da invenção que compreendem sítios de domínio único são usados para os mesmos fins como anticorpos obtidos, por exemplo, a partir de hibridomas, camundongos transgênicos expressando anticorpos humanos, e bibliotecas de exibição de fagos de domínios de ligação Fab ou scFv.

Os anticorpos da invenção são de tipo imunoglobulina em vários aspectos. 1) Os anticorpos da invenção que são de tipo IgG são heterotetrâmeros, consistindo de duas dentre cada uma das duas cadeias de polipeptídeos dissimilares. 2) As cadeias de polipeptídeos dissimilares associam-se e podem ser covalentemente ligadas, por exemplo, por ligações dissulfeto do mesmo modo que as regiões constantes de cadeias leve e pesada de imunoglobulinas de ocorrência natural, padrão. 3) Uma das cadeias de polipeptídeos é capaz de auto-associação estável no modo das cadeias pesadas de imunoglobulina de ocorrência natural. Por exemplo, uma das cadeias de polipeptídeos pode incluir um ou mais domínios correspondentes a C_{H2} , C_{H3} ou C_{H4} de uma imunoglobulina de ocorrência natural. Em uma forma de realização preferida, um anticorpo da invenção compreende a estrutura de

domínio constante de uma IgG de ocorrência natural.

Uma vantagem enorme de uma estrutura de tipo de imunoglobulina é que as cadeias de anticorpos formam pares naturalmente quando da expressão. Diferente de muitos anticorpos tetraméricos da técnica anterior, nenhuma outra manipulação é necessária para obter uma preparação de anticorpos homogêneos.

As proteínas de ligação a antígeno da invenção compreendem sítios de ligação a antígeno que são domínios variáveis únicos (sVDs). Em certas formas de realização da invenção, um sítio de ligação sVD substitui um domínio variável de um anticorpo de tipo IgG, e um scFv substitui o outro domínio variável. Exemplos destas formas de realização são descritos na figura 1A. Em outras formas de realização da invenção, um sítio de ligação sVD é enxertado em um anticorpo IgG no término N ou término C da cadeia leve e pesada de IgG. Exemplos destas formas de realização são mostrados na figura 1B. Os sVDs também podem ser incorporados em um anticorpo de tipo de imunoglobulina em outras posições. Por exemplo, os sVDs podem ser fixados ao término C dos domínios constantes C_H e/ou C_L . Além disso, combinando as substituições dos sítios de ligação sVD, como na figura 1, com adições de sítios de ligação sVD ao término dos domínios constantes C_H e/ou C_L , anticorpos de tipo IgG que são multiespecíficos e/ou multivalentes para um antígeno particular podem ser produzidos.

Como se sabe, um Fv consiste de dois domínios (por exemplo, um domínio V_H e um domínio V_L). Em um anticorpo padrão, os domínios V_H e V_L de Fv, embora associados para formar um sítio de ligação a antígeno, não estão diretamente ligados, mas são cada um unidos a regiões constantes de anticorpos ligados. Os domínios V_H e V_L de Fv também podem ser unidos com um ligador sintético para formar um Fv de cadeia única (scFv).

A especificidade do anticorpo refere-se ao reconhecimento seletivo do anticorpo por um epítopo particular de um antígeno. Anticorpos

naturais, por exemplo, são monoespecíficos. Os anticorpos biespecíficos (BsAbs) são anticorpos que têm dois sítios ou especificidades de ligação a antígeno diferentes. Quando uma proteína de ligação a antígeno tem mais do que uma especificidade, os epítomos reconhecidos podem ser associados com um antígeno único ou com mais do que um antígeno.

Uma molécula de anticorpo natural é composta de duas cadeias pesadas idênticas e duas cadeias leves idênticas. Cada cadeia leve é covalentemente ligada a uma cadeia pesada por uma ligação dissulfeto intercadeia. As duas cadeias pesadas são ainda ligadas umas à outras por ligações dissulfeto múltiplas na região de gancho. As cadeias individuais duplicam em domínios tendo tamanhos similares (cerca de 110-125 aminoácidos) e estruturas, mas funções diferentes. A cadeia leve compreende um domínio variável (V_L) e um domínio constante (C_L). A cadeia pesada compreende um domínio variável (V_H) e, dependendo da classe ou isotipo do anticorpo, três ou quatro domínios constantes (C_{H1} , C_{H2} , C_{H3} e C_{H4}). Em camundongos e humanos, os isotipos são IgA, IgD, IgE, IgG e IgM, com IgA e IgG ainda subdivididos em subclasses ou subtipos. A porção de um anticorpo consistindo de domínios V_L e V_H é designada “Fv” e constitui o sítio de ligação a antígeno. Um Fv de cadeia única (scFV) é uma proteína engenheirada contendo um domínio V_L e um domínio V_H em uma cadeia de polipeptídeo, em que o término N de um domínio e o término C do outro domínio são unidos por um ligador flexível. “Fab” refere-se à porção do anticorpo consistindo dos domínios V_L , V_H , C_L e C_{H1} .

Os domínios variáveis mostram considerável variabilidade de seqüência de aminoácidos de um anticorpo para o seguinte, particularmente na localização do sítio de ligação a antígeno. Três regiões, denominadas “hiper-variáveis” ou “regiões de determinação da complementaridade” (CDRs) são encontradas em cada um dentre V_L e V_H .

“Fc” é a designação para a porção de um anticorpo que

compreende domínios constantes de cadeia pesada formados aos pares. Em um anticorpo IgG₁, por exemplo, o Fc compreende domínios C_H2 e CH₃. O Fc de um anticorpo IgA ou IgM ainda compreende um domínio C_H4. O Fc é associado com ligação do receptor de Fc, ativação de citotoxicidade mediada pelo complemento e citotoxicidade celular dependente de anticorpo. Para anticorpos naturais como IgA e IgM, que são complexos de proteínas de tipo IgG múltiplas, a formação do complexo requer domínios constantes de Fc.

Finalmente, a região de “gancho” separa as porções Fab e Fc do anticorpo, provendo mobilidade de Fabs com relação um ao outro e com relação a Fc, bem como incluindo ligações múltiplas de dissulfeto para ligação covalente das cadeias pesadas.

Anticorpos da invenção têm uma combinação de aspectos desejáveis. Primeiramente, eles são essencialmente homogêneos. Por projeto, a formação errada de pares de cadeias leves e pesadas de anticorpos é muito reduzida ou eliminada. Por exemplo, alguns anticorpos biespecíficos fazem uso de duas cadeias pesadas diferentes para proporcionar duas especificidades. Quatro combinações são possíveis quando estas cadeias pesadas são arranjadas em uma molécula tipo IgG. Duas destas consistem de cadeias pesadas com formação errada de pares de modo que o produto é monoespecífico. Nos anticorpos da invenção, a formação errada de pares é substancialmente eliminada.

Um segundo aspecto dos anticorpos da invenção é que eles são bivalentes para cada especificidade de ligação. Muitos anticorpos biespecíficos são monovalentes para cada um dos sítios de ligação a anticorpo que estão incluídos. Isto é significativo para a função dos anticorpos porque a bivalência permite o cooperativismo de ligação e um aumento significativo na avidéz de ligação com relação a uma molécula compreendendo um sítio de ligação específico de antígeno.

Uma terceira vantagem dos anticorpos da invenção é que um

ou mais domínios constantes de cadeia pesada que constituem a região Fc (por exemplo, C_H2 e/ou C_H3 para uma molécula de IgG₁) de um anticorpo natural e que provê outras funções de anticorpos estão presentes. Além disso, os domínios de ligação múltiplos são separados dos domínios constantes de modo que as funções providas pelos domínios constantes não são afetadas. As

5 funções de domínios constantes incluem ligação a certas moléculas acessórias (por exemplo, ligação à superfície de células e receptores de Fc solúveis, associação de cadeia J para IgA, IgM, proteína S para IgA), ativação da via de complemento (citotoxicidade dependente de complemento, CDC),

10 reconhecimento da ligação de anticorpos a células alvos por várias populações de leucócitos diferentes (citotoxicidade mediada por células dependente de anticorpos, ADCC) e opsonização (melhora de fagocitose). Também, o(s) domínio(s) constante(s) de cadeia pesada de Fc pode(m) conferir meia vida sérica aumentada.

15 Uma quarta vantagem das proteínas da invenção é que não é necessário o processamento *in vitro* para obter o produto completo. Embora re-arranjado de um modo artificial, cada um dos domínios tem um caráter natural que permite a expressão em um sistema biológico. Por exemplo, anticorpos biespecíficos podem ser expressados em sistemas de expressão

20 procarióticos e eucarióticos. As proteínas que são produzidas são substancialmente biespecíficas.

Os sítios de ligação a antígeno sVD e sítios de ligação contendo a região Fc para uso em um anticorpo da invenção podem ser obtidos por uma variedade de métodos. As seqüências de aminoácidos das

25 porções V_H e/ou V_L de um domínio de ligação selecionado podem ser obtidas a partir de um anticorpo de ocorrência natural ou ser escolhidas ou modificadas, triadas ou selecionadas para características de ligação desejadas. Por exemplo, os domínios V_H e/ou V_L podem ser obtidos diretamente a partir de um anticorpo monoclonal que tem as características de ligação desejadas.

Alternativamente, os domínios V_H e/ou V_L podem ser de bibliotecas de seqüências de genes V de um mamífero de escolha. Os elementos destas bibliotecas expressam combinações aleatórias dos domínios V_H e/ou V_L e são triados com qualquer antígeno desejado para identificar os elementos que têm características de ligação desejadas. Particularmente preferida é uma biblioteca de genes V humanos. Os métodos para a triagem são conhecidos na técnica. Alternativamente, os domínios V_H e/ou V_L de uma fonte não humana selecionada podem ser incorporados em anticorpo quimérico que compreende domínios constantes humanos. Por exemplo, para administração a um humano, pode-se desejar usar um anticorpo com um ou mais domínios constantes humanos funcionais em que os domínios V_H e V_L são selecionados de uma fonte não humana. Para maximizar a função associada ao domínio constante ou reduzir a imunogenicidade do anticorpo, domínios constantes humanos são preferidos.

Alternativamente, um domínio V pode ser produzido, que é “humanizado”. Domínios variáveis humanizados são construídos, em que as seqüências de aminoácidos que compreendem uma ou mais regiões determinantes de complementaridade (CDRs) de origem não humana são enxertadas em regiões de armação humanas (FRs). Para exemplos, ver: Jones, P.T. et al., 1996, *Nature* 321, 522-25; Riechman, L. Et al., 1988, *Nature* 332, 323-27; e patente US 5.530.101 para Queen et al. Uma construção humanizada é particularmente valiosa para a eliminação de características imunogênicas adversas, por exemplo, quando um domínio de ligação a antígeno de uma fonte não humana é desejado para ser usado para tratamento de um humano. Os domínios variáveis têm um alto grau de homologia estrutural, permitindo a fácil identificação de resíduos de aminoácidos em domínios variáveis que correspondem a CDRs e FRs. Ver, por exemplo, Kabat, E.A. et al., 1991, *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5^a edição, National Center for Biotechnology Information, National Institutes of

Health, Bethesda, MD. Assim, os aminoácidos que participam na ligação a antígeno são facilmente identificados. Além disso, foram desenvolvidos métodos para conservar ou para melhorar a afinidade para antígeno de domínios de ligação humanizados compreendendo CDRs enxertados. Um modo consiste em incluir no domínio variável do recipiente os resíduos de armação estranhos que influenciam a conformação das regiões de CDR. Um segundo modo é enxertar os CDRs estranhos sobre domínios variáveis humanos com a homologia mais próxima à região variável estranha. Queen, C. et al., 1989, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86, 10029-33. CDRs são mais facilmente enxertados sobre FRs diferentes amplificando-se, em primeiro lugar, as seqüências individuais usando iniciadores de sobreposição que incluem seqüências de CDR desejadas, e unindo os segmentos de genes resultantes em reações de amplificação subseqüentes. O enxerto de um CDR sobre um domínio variável diferente pode ainda envolver a substituição de resíduos de aminoácidos que são adjacentes ao CDR na seqüência de aminoácidos ou alocados contra o CDR na estrutura de domínio variável duplicada que afeta a conformação do CDR. Os domínios variáveis humanizados da invenção, assim, incluem domínios humanos que compreendem um ou mais CDRs não humanos bem como tais domínios em que outras substituições ou mudanças foram feitas para conservar ou melhorar as características de ligação.

Um anticorpo da invenção também pode empregar domínios variáveis que foram tornados menos imunogênicos por substituição de resíduos expostos na superfície de modo a fazer o anticorpo parecer como pertencendo ao sistema imune (Padlan, E.A., 1991, *Mol. Immunol.* 28, 489-98). Os anticorpos foram modificados por este processo sem perda de afinidade (Roguska et al., 1994, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91, 969-973). Devido ao envelope interno de resíduos de aminoácidos na proximidade do sítio de ligação a antígeno permanecer inalterada, a afinidade é conservada. A

substituição de resíduos expostos na superfície, de acordo com a invenção, visando imunogenicidade reduzida, não significa a substituição de resíduos de CDR ou resíduos adjacentes que influenciam as características de ligação.

É preferível, com freqüência, empregar domínios variáveis que são essencialmente humanos. Os domínios de ligação humanos podem ser obtidos a partir de bibliotecas de exibição de fagos, em que as combinações de domínios variáveis de cadeia leve e pesada humanos são exibidas na superfície de fago filamentoso (Ver, por exemplo, McCafferty et al., 1990, *Nature* 348, 552-54; Aujame et al., 1997, *Human Antibodies* 8, 155-68). As combinações de domínios variáveis são tipicamente exibidas no fago filamentoso na forma de Fabs ou scFvs. A biblioteca é triada para combinações de domínios variáveis contendo fagos tendo características de ligação a antígeno desejadas. Combinações de domínio variável e de domínio único exibem alta afinidade para um antígeno selecionado e uma pequena reatividade cruzada para outros antígenos relacionados. Triando repertórios muito grandes de fragmentos de anticorpo (ver, por exemplo, Griffiths et al., 1994, *EMBO J.* 13, 3245-60), uma boa diversidade de domínios de ligação de alta afinidade é isolada, esperando-se que muitos tenham afinidades sub-nanomolares para o antígeno desejado.

Alternativamente, os domínios de ligação humanos podem ser obtidos de animais transgênicos em que os segmentos de genes Ig não rearranjados foram introduzidos e em que os genes Ig de camundongo endógeno foram inativados (revisto em Bruggemann e Taussig, 1997, *Curr. Opin. Biotechnol.* 8, 455-58). Animais transgênicos preferidos contêm fragmentos de genes Ig contíguos muito grandes que estão acima de 1 Mb em tamanho (Mendez et al., 1997, *Nature Genet.* 15, 146-56), mas Mabs humanos de afinidade moderada podem ser aumentados de animais transgênicos contendo *loci* de genes menores (Ver, por exemplo, Wagner et al., *Eur. J. Immunol.* 42, 2672-81; Green et al., 1994, *Nature Genet.* 7, 13-21).

Os sítios de ligação sVD podem ser obtidos de regiões Fv específicas (que compreendem ambos os domínios V_H e V_L). Com frequência, pode ser demonstrado que a afinidade de ligação e especificidade de uma região Fv é dada primeiro por um dos domínios variáveis. Além disso, o scFv
5 pode ser obtido diretamente. Fontes diretas de sVDs incluem mamíferos (por exemplo, camelídeos) que expressam naturalmente anticorpos contendo somente o domínio V_H e bibliotecas de exibição de fagos construídas para expressar somente um domínio variável único. Por exemplo, uma biblioteca de exibição de fagos de anticorpo de domínio humano está comercialmente
10 disponível de Domantis (Cambridge, Reino Unido). Como exemplificado aqui, sítios de ligação sVD específicos para PDGFR α foram obtidos de uma biblioteca de fagos contendo variantes em que o domínio V_L foi espontaneamente deletado.

Em uma resposta imune fisiológica, mutação e seleção de
15 genes de anticorpo expressados levam à produção de anticorpos tendo alta afinidade para seu antígeno alvo. Os domínios V_H e V_L incorporados nos anticorpos da invenção podem ser similarmente submetidos a procedimentos de mutação *in vitro* e triagem para obter variantes de alta afinidade. Assim, os domínios de ligação da invenção incluem os para os quais as características de
20 ligação são melhoradas por mutação direta ou por métodos de maturação por afinidade. A afinidade e especificidade podem ser modificadas ou melhoradas mudando os CDRs e triando sítios de ligação a antígeno tendo as características desejadas (Ver, por exemplo, Yang et al., 1995. *J. Mol. Bio.* 254, 392-403). Deve-se entender que os resíduos de aminoácidos que são
25 determinantes primárias da ligação de anticorpos de domínio único podem estar em CDRs definidos por Kabat, mas podem incluir outros resíduos também, como, por exemplo, resíduos que podem ser de outro modo enterrados na interface de V_H - V_L de um heterodímero de V_H - V_L . CDRs ou outros resíduos que determinam ligação são mudados em uma variedade de

modos. Um modo é randomizar os resíduos individuais ou combinações de resíduos de modo que os sítios de ligação a antígeno idênticos, todos de vinte aminoácidos, ou um subconjunto dos mesmos, são encontrados em posições particulares. Além disso, as mutações são induzidas em uma faixa de resíduos de CDR por métodos de PCR propenso a erro (Ver, por exemplo, Hawkins et al., 1992, *J. Mol. Bio.* 226, 889-96). Vetores de exibição de fagos contendo genes codificando os domínios de ligação (por exemplo, genes de região variável de cadeia pesada e/ou leve) podem ser propagados em cepas *mutator* de *E. coli* (Ver, por exemplo, Low et al., 1996, *J. Mol. Bio.* 250, 359-68). Estes métodos de mutagenese são ilustrativos de muitos métodos conhecidos por um versado na técnica.

Cada domínio variável dos anticorpos da presente invenção pode ser um domínio variável de cadeia leve ou pesada de imunoglobulinas completo, ou pode ser um equivalente funcional ou um mutante ou derivado de um domínio de ocorrência natural, ou um domínio sintético construído, por exemplo, *in vitro* usando uma técnica como a descrita em WO 93/11236 (Medical Research Council / Griffiths et al.). Por exemplo, é possível incorporar domínios correspondendo os domínios variáveis de anticorpos em que estão faltando um ou mais aminoácidos. O aspecto característico importante é a capacidade de cada domínio variável de se associar com um domínio variável complementar para formar um sítio de ligação a antígeno.

Proteínas de ligação a antígeno da invenção têm sítios de ligação para qualquer epítipo, sítio antigênico ou proteína. De particular interesse são os anticorpos que são utilizáveis para o tratamento de doença. Os anticorpos preferidos neutralizam proteínas de receptor, como receptores que estão envolvidos em angiogenese e/ou oncogenese. Neutralizar um receptor significa inativar a atividade de quinase intrínseca do receptor para transduzir um sinal. Um teste confiável para a neutralização do receptor é a inibição de fosforilação do receptor. A presente invenção não está limitada a

qualquer mecanismo particular de neutralização de receptor. Alguns mecanismos possíveis incluem prevenir a ligação do ligando ao domínio de ligação extracelular do receptor, e prevenir a dimerização ou oligomerização do receptor. Outros mecanismos não podem, no entanto ser excluídos.

5 A neutralização da ativação de um receptor em uma amostra de células endoteliais ou não endoteliais, como células de tumor, pode ser realizada *in vitro* ou *in vivo*. A neutralização da ativação de um receptor em uma amostra de receptor expressando células compreende contatar as células com um anticorpo da invenção. *In vitro*, as células são contatadas com o
10 anticorpo antes, simultaneamente com, ou após adicionar VEGF à amostra de célula. *In vivo*, um anticorpo da invenção é contatado com um receptor por administração a um mamífero. Métodos de administração a um mamífero incluem, por exemplo, administração oral, intravenosa, intraperitoneal, subcutânea ou intramuscular.

15 Exemplos destes receptores incluem, mas não estão limitados a receptor de fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF-R), receptores VEGF (por exemplo, VEGFR-2/KDR/Flk-1, VEGFR1/Flt-1, VEGFR3/Flt-4), receptor de fator de crescimento epidérmico (EGFR), receptor de fator de crescimento como insulina (IGFR) e outros. Outros exemplos não limitantes
20 de receptor tirosina quinases incluem Flt-4, HER2/neu, Tek e Tie2.

 Outros fatores implicados como possíveis reguladores de angiogênese e/ou crescimento de tumores *in vivo* incluem o fator de crescimento de fibroblastos (FGF), e o fator de crescimento de nervos (NGF). Os receptores correspondentes são o fator de crescimento de fibroblastos
25 (FGF-R), e o fator de crescimento de nervos (NGFR). Um outro receptor implicado em migração celular, mudanças morfológicas e invasividade é o receptor de proteína estimulando macrófagos (“MSP-R” ou “RON”). Receptores de interesse incluem proteínas humanas e homólogos de outros mamíferos.

Anticorpos da invenção podem incorporar domínios de ligação a antígeno Ig de qualquer fonte. Por exemplo, os anticorpos são conhecidos para os receptores listados acima e são fontes de domínios V_H e V_L para uso nos anticorpos da presente invenção. Exemplos de domínios de ligação de regiões variáveis de scFv específicos para KDR incluem, por exemplo, os domínios V_H e V_L de IMC-1C11 (seqüências de nucleotídeos e de aminoácidos de V_H : SEQ ID NOs: 1 e 2; seqüências de nucleotídeos e de aminoácidos de V_L : SEQ ID Nos: 3 e 4) (ver, WO 00/44777), IMC-2C6 (seqüências de nucleotídeos e de aminoácidos para V_H : SEQ ID Nos: 5 e 6; seqüências de nucleotídeos e de aminoácidos de V_L : SEQ ID Nos: 7 e 8) (ver WO 03/075840), e IMC-1121 (seqüências de nucleotídeos e de aminoácidos de V_H : SEQ ID Nos: 5 e 6; seqüências de nucleotídeos e de aminoácidos de V_L : SEQ ID Nos: 9 e 10) (ver, WO 03/075840). Exemplos de domínios de ligação específicos para Flt-1 incluem 6.12 (seqüências de nucleotídeos e de aminoácidos de V_H : SEQ ID Nos: 11 e 12; seqüências de nucleotídeos e de aminoácidos de V_L : SEQ ID Nos: 13 e 14) e IMC-18F1 (seqüências de nucleotídeos e de aminoácidos de V_H : SEQ ID Nos: 27 e 28; seqüências de nucleotídeos e de aminoácidos de V_L : SEQ ID Nos: 29 e 30).

Domínios de ligação específicos para EGFR incluem, por exemplo, ERBITUX[®] (Cetuximab; IMC-C225) (seqüências de nucleotídeos e de aminoácidos de V_H : SEQ ID Nos: 15 e 16; seqüências de nucleotídeos e de aminoácidos de V_L : SEQ ID Nos: 17 e 18) como descrito em WO 96/40210 e IMC11F8 (seqüências de nucleotídeos e de aminoácidos de V_H : SEQ ID Nos: 19 e 20; seqüências de nucleotídeos e de aminoácidos de V_L : SEQ ID Nos: 21 e 22). Um exemplo de um domínio de ligação específico para IGFR é IMC-A12 (seqüências de nucleotídeos e de aminoácidos de V_H : SEQ ID Nos: 23 e 24; seqüências de nucleotídeos e de aminoácidos de V_L : SEQ ID Nos: 25 e 26). Anticorpos que se ligam a receptores FGT (ver, WO 2005/037235) (ver, WO 2005/037235) incluem, por exemplo, FR1-H7 (seqüências de

nucleotídeos e de aminoácidos de V_H: SEQ ID Nos: 31 e 32); seqüências de nucleotídeos e de aminoácidos de V_L: SEQ ID Nos: 33 e 34), FR1-A1 (seqüências de nucleotídeos e de aminoácidos de V_H: SEQ ID Nos: 35 e 36; seqüências de nucleotídeos e de aminoácidos de V_L: SEQ ID Nos: 37 e 38), e
5 FR1-4H (seqüências de nucleotídeos e de aminoácidos de V_H: SEQ ID Nos: 39 e 40; seqüências de nucleotídeos e de aminoácidos de V_L: SEQ ID Nos 41 e 42). Anticorpos que se ligam a RON ou MSP-R (ver, WO 2005/120557) incluem IMC-41A10 (seqüências de nucleotídeos e de aminoácidos de V_H: SEQ ID Nos: 43 e 44; seqüências de nucleotídeos e de aminoácidos de V_L:
10 SEQ ID Nos: 45 e 46) e IMC-41B12 (seqüências de nucleotídeos e de aminoácidos de V_H: SEQ ID Nos: 47 e 48; seqüências de nucleotídeos e de aminoácidos de V_L: SEQ ID Nos: 49 e 50). Anticorpos que se ligam a PDGFR α incluem, por exemplo, 3G3 e 7G11 (Loizos et al., 2005, Mol. Cancer Ther. 4: 369).

15 Além disso, porções dos domínios de ligação listados acima, como as regiões de CDR, podem ser incorporadas nos domínios de ligação usados para produzir as proteínas de ligação aqui descritas.

Certos anticorpos preferidos ligam-se a dois dos receptores listados acima. Em uma forma de realização da invenção, uma proteína de
20 ligação a antígeno biespecífica liga-se a e bloqueia a ativação de dois receptores tirosina quinases diferentes envolvidos em angiogenese. Nesta forma de realização, o anticorpo liga-se a PDGFR e um receptor VEGF como, por exemplo, VEGFR2/Flk-1/KDR. Em uma outra forma de realização, o anticorpo liga-se a KDR e FLT-1.

25 Em outra forma de realização, um anticorpo da invenção liga-se a HER2 e EGFR. Ainda em uma outra forma de realização, um anticorpo da invenção liga-se a EGFR e IGFR.

Em outra forma de realização, uma proteína de ligação a antígeno da invenção liga-se a EGFR e VEGFR. Em uma forma de realização

preferida, o VEGFR é VEGFR2. O anticorpo é utilizável para bloquear o estímulo de células epiteliais vasculares, bloqueando a transdução de sinal através de ambos EGFR e VEGFR. Isto é particularmente utilizável onde angiogênese ocorre em resposta a ligandos de EGFR, particularmente TGF α , secretados por células de tumor.

Anticorpos da invenção podem ser usados para reticular antígenos em células alvos com antígenos em células efectoras do sistema imune. Isto pode ser utilizável, por exemplo, ao se promover respostas imunes dirigidas contra células que têm antígenos particulares de interesse sobre a superfície de células. De acordo com a invenção, as células efectoras do sistema imune incluem células específicas de antígeno como células T que ativam respostas imunes celulares e células não específicas como macrófagos, neutrófilos e células exterminadoras naturais (NK) que mediam respostas imunes celulares.

Anticorpos da invenção podem ter um sítio de ligação para qualquer antígeno de superfície de células de uma célula efectora do sistema imune. Estes antígenos de superfície de células incluem, por exemplo, receptores de citocina e linfocina, receptores Fc, CD3, CD16, CD28, CD32 e CD64. Além dos sítios de ligação a antígeno providos por sVDs, os anticorpos biespecíficos podem incluir sítios de ligação providos por Fvs. Os Fvs podem ser obtidos de anticorpos nos antígenos acima mencionados, a partir de bibliotecas combinatoriais, bem como por outros métodos conhecidos na técnica. Os anticorpos biespecíficos que são específicos para receptores citocina e linfocina também podem incluir sítios de ligação compreendendo seqüências de aminoácidos que correspondem a toda ou parte do ligando natural para o receptor. Por exemplo, quando o antígeno de superfície de células é um receptor IL-2, um anticorpo biespecífico da invenção pode ter um sítio de ligação a antígeno que compreende uma seqüência de aminoácidos correspondente ou IL-2. Outras citocinas e

linfoquinas incluem, por exemplo, interleucinas como interleucina-4 (IL-4) e interleucina-5 (IL-5), e fatores de estímulo de colônias (CSFs) como CSF de granulócito- macrófago (GM-CSF), e CSF de granulócito (G-CSF).

Anticorpos da invenção são produzidos expressando duas
5 cadeias de polipeptídeo que, tomadas juntas, compreendem pelo menos um sítio de ligação a antígeno de domínio único. As duas cadeias de polipeptídeo compreendem cada uma pelo menos um domínio constante de cadeia pesada que é capaz de dimerização (por exemplo, C_{H2} e/ou C_{H3}). Os anticorpos são convenientemente produzidos em *E. Coli* usando construções de DNA que
10 compreendem seqüências de sinal de secreção bacteriana no início de cada cadeia de polipeptídeo. Uma variedade de seqüências de sinal bacterianas é conhecida na técnica. Uma seqüência de sinal preferida é do gene *pelB* de *Erwinina carotovora*. Os fragmentos de DNA codificando os anticorpos a serem clonados, por exemplo, em vetores empregando melhoradores e
15 promotores de citomegalovírus humanos (HCMV) para expressão em alto nível em células de mamífero, como, por exemplo, células CHO, NS0, COS-7 e PER.C6, e linhagens de células de origem linfóide como células de linfoma, mieloma e hibridoma. (Ver, por exemplo, Bendig et al., patente US 5.840.299; Maeda et al. (1991) *Hum. Antibod. Hybridomas* 2, 124-34).

20 Um marcador selecionável é um gene que codifica uma proteína necessária para a sobrevivência ou crescimento de células hospedeiras transformadas cultivadas em um meio de cultura seletivo. Os marcadores selecionáveis típicos codificam proteínas que (a) conferem resistência a antibióticos ou outras toxinas, por exemplo, ampicilina,
25 neomicina, metotrexato ou tetraciclina, (b) complementam deficiências auxotróficas, ou (c) fornecem nutrientes críticos não disponíveis de meios complexos, por exemplo, o gene codificando D-alanina racemase para bacilos. Um marcador selecionável particularmente utilizável confere resistência a metotrexato. Por exemplo, células transformadas com o gene de

seleção DHFR são primeiro identificadas cultivando todos os transformantes em um meio de cultura que contém metotrexato (Mtx), um antagonista competitivo de DHFR. Uma célula hospedeira apropriada quando DHFR do tipo selvagem é empregado é a linhagem de células de ovário de hamster chinês (CHO) deficiente em atividade de DHFR, preparada e propagada como descrito por Urlaub e Chasin (1980) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77, 4216. As células transformadas são então expostas a níveis aumentados de metotrexato. Isto leva à síntese de cópias múltiplas do gene DHFR, e, concomitantemente, cópias múltiplas de outro DNA compreendendo os vetores de expressão, como o DNA codificando o anticorpo ou fragmento de anticorpo.

Quando se deseja expressar uma construção de gene em levedura, um exemplo de um gene de seleção apropriado para uso em levedura é o gene *trp1* presente no plasmídeo de levedura YRp7. Stinchcomb et al. (1979) *Nature*, 282, 39; Kingsman et al. (1979) *Gene* 7, 141. O gene *trp1* provê um marcador de seleção para uma cepa mutante de levedura deficiente da capacidade de cultura em triptofano, por exemplo, ATCC no. 44076 ou PEP4-1. Jones (1977) *Genetics* 85,12. A presença de lesão de *trp1* no genoma de células hospedeiras de levedura então provê um ambiente efetivo para detectar a transformação por cultura na ausência de triptofano. Similarmente, cepas de levedura deficientes em *Leu2* (ATCC 20.622 ou 38.626) são complementadas por plasmídeos conhecidos contendo o gene *Leu2*.

Células hospedeiras transformadas são cultivadas por métodos conhecidos na técnica em um meio líquido contendo fontes assimiláveis de carbono, por exemplo, carboidratos como glicose ou lactose, nitrogênio, por exemplo, aminoácidos, peptídeos, proteínas ou seus produtos de degradação como peptonas, sais de amônio ou outros, e sais inorgânicos, por exemplo, sulfatos, fosfatos e/ou carbonatos de sódio, potássio, magnésio e cálcio. O meio, além disso, contém, por exemplo, substâncias promotoras de

crescimento, como elementos traço, por exemplo, ferro, zinco, manganês e outros.

Anticorpos que se ligam a receptores de fator de crescimento são preferivelmente capazes de bloquear a inativação da atividade do receptor
5 tirosina quinase (RTK). A inibição de tirosina quinase pode ser determinada usando métodos bem conhecidos, por exemplo, medindo o nível de autofosforilação do receptor quinase recombinante, e/ou fosforilação de substratos naturais ou sintéticos. Assim, testes de fosforilação são utilizáveis na determinação dos antagonistas de RTK da presente invenção. A
10 fosforilação pode ser detectada, por exemplo, usando um anticorpo específico para fosfotirosina em um teste ELISA ou em um western blot. Alguns testes para atividade de tirosina quinase são descritos em Panek et al., J. Pharmacol. Exp. Thera. (1997) 283: 1433-44 e Batley et al., Life Sci. (1998) 62: 143-50.

Além disso, métodos para detecção da expressão de proteínas
15 podem ser utilizados para determinar os antagonistas de RTK, onde a expressão de proteínas sendo medidas é mediada pelo RTK. Estes métodos incluem imuno-histoquímica (IHC) para detecção da expressão de proteína, fluorescência, hibridização *in situ* (FISH) para detecção da amplificação do gene, testes de ligação a radioligandos competitivos, técnicas de *blotting* de
20 matriz sólida, como Northern e Southern blot, reação de cadeia de polimerase de transcriptase reversa (RT-PCR) e ELISA. Ver, por exemplo, Grandis et al., Cancer, (1996) 78: 1284-92; Shimizu et al., Japan J. Câncer Res., (1994) 85: 567-71; Sauter et al., Am. J. Path., (1996) 148: 1047-53; Collins, Glia, (1995) 15: 289-96; Radinsky et al., Clin. Cancer Res., (1995) 1: 19-31; Petrides et al.,
25 Cancer Res., (1990) 50: 3934-39; Hoffmann et al., Anticancer Res., (1997) 17: 4419-26; Wikstrand et al., Cancer Res. (1995) 55: 3140-48.

A capacidade de um anticorpo bloquear a ligação ao ligando pode ser medida, por exemplo, por um teste competitivo *in vitro*. Neste teste, um ligando de RTK (por exemplo, EGF para EGFR) é imobilizado, e um teste

de ligação é realizado para determinar a efetividade do anticorpo para inibir competitivamente a ligação de RTK ao ligando imobilizado.

5 Testes *in vivo* também podem ser utilizados para determinar antagonistas de RTK. Por exemplo, a inibição do receptor tirosina quinase pode ser observada por testes mitogênicos usando linhagens de células estimuladas com ligando de receptor na presença ou ausência de inibidor. Por exemplo, células A431 (American Type Culture Collection (ATCC), Rockville, MD) estimuladas com EGF podem ser usadas para testar a inibição de EGFR. Um outro método envolve testar a inibição do crescimento de 10 células de tumor expressando EGFR, usando, por exemplo, células de tumor humanas injetadas em um camundongo. Ver patente US nº. 6.365.157 (Rockwell et al.).

Anticorpos preferidos da presente invenção têm especificidade dual e são capazes de ligar-se a dois antígenos diferentes simultaneamente. Os 15 antígenos diferentes podem estar localizados em células diferentes ou na mesma célula. A reticulação do antígeno pode ser mostrada *in vitro*, por exemplo provendo uma superfície sólida à qual um primeiro antígeno é ligado, adicionando anticorpos biespecíficos específicos para o primeiro antígeno e um segundo antígeno para o qual a proteína de ligação é também 20 específica e detectando a presença do segundo antígeno ligado.

Anticorpos preferidos da invenção são capazes de bloquear a interação entre dois receptores e seus respectivos ligandos. Por exemplo, um anticorpo específico para KDR e Flt-1 inibe a migração de células induzida por VEGF bem como a migração de células induzida por PlGF. A 25 combinação de duas especificidades de ligação ao receptor em anticorpos biespecíficos pode ser mais eficaz na inibição da migração de células do que dos anticorpos parentais individuais (ver, por exemplo, Zhu, Z., WO 2004/003211).

Comparados a anticorpos que são monoespecíficos, os

anticorpos biespecíficos podem ser inibidores mais potentes da função celular. Por exemplo, funções celulares estimuladas por VEGF como, por exemplo, a proliferação de células endoteliais e a migração induzida por VEGF e PlGF de células de leucemia humanas podem ser mais eficientemente inibidas por anticorpos biespecíficos mesmo quando a afinidade para um ou ambos dos dois antígenos de **alvo** é reduzida. Um anticorpo específico (monovalente) para ambos KDR e Flt-1 pode ser mais efetivo para inibir a migração de células induzida por VEGF ou PlGF do que um scFv mono específico dirigido a qualquer um dos antígenos de **alvo** (WO 2004/003211).

10 Em um outro exemplo, um anticorpo tendo especificidade dual para ambos EGFR (ou Her2/neu) e IGFR que é capaz de ligar a ambos os receptores e bloquear a interação com seus ligandos específicos é usado para neutralizar a ativação do receptor estimulado tanto por EFG como por IGF e transdução de sinal a jusante. Observa-se que o estímulo de qualquer de

15 EGFR ou IGFR resulta em ativação (por exemplo, fosforilação) de moléculas de transdução de sinal a jusante comuns, incluindo Akt e p44/42, embora em extensões diferentes. Em certas células de tumor, a inibição da função de EGFR pode ser compensada por regulação positiva de outras vias de sinalização do receptor do fator de crescimento, e particularmente por

20 estímulo de IGFR. Em contraste com tratamento com um anticorpo que se liga a um receptor, e não bloqueia completamente fosforilação tanto de Akt como p44/42, a incubação de células de tumor com um anticorpo que se liga a tanto EGFR como IGFR bloqueia a fosforilação de tanto Akt como de p44/42. Conseqüentemente, a inibição da sinalização de IGFR resulta na inibição do

25 crescimento de tumor e sensibilidade aumentada para células de tumor em determinados agentes terapêuticos.

A inibição de fosforilação de tais componentes da cascata de transdução de sinal comuns também é observada com anticorpos que se ligam a outros RTKs, como, por exemplo, RON. Conseqüentemente, as proteínas de

ligação a antígeno são geralmente utilizáveis para tratar doenças neoplásicas caracterizadas pela transformação ou crescimento de células resultantes da ativação de vias de transdução de sinal múltiplas.

Os anticorpos da invenção são utilizáveis para tratamento de uma variedade de distúrbios proliferativos. Por exemplo, a presente invenção provê tratamento de tumores que expressam e são estimulados através de mais do que um receptor tirosina quinase. O estímulo através de mais do que um receptor pode resultar no crescimento descontrolado que é insensível ao bloqueio de cada receptor sozinho. Além disso, o estímulo de um segundo receptor pode aumentar a ativação observada em resposta a estímulo através de um primeiro receptor. Alternativamente, as contribuições de receptores individuais podem ser multiplicativas. Em cada um dos casos acima, a inibição significativamente melhorada de crescimento de tumor é observada na presença de uma proteína de ligação a antígeno que bloqueia ambos os receptores.

Os anticorpos da invenção são utilizáveis para o tratamento de doenças em que o estímulo do receptor é através de uma ativação de EGFR parácrina e/ou autócrina. Por exemplo, tumores expressando EGFR são caracteristicamente sensíveis a EGF presente em seu ambiente, e podem ainda ser estimulados por EGF ou TGF- α produzidos no tumor. Apesar de não pretender estar limitado por qualquer mecanismo particular, as doenças e condições que podem ser tratadas ou prevenidas pelos presentes métodos incluem, por exemplo, as em que o crescimento de tumor é estimulado. O método é, assim, efetivo para tratar um tumor sólido que não é vascularizado, ou ainda não está substancialmente vascularizado.

Alguns anticorpos da invenção são utilizáveis para inibir a angiogênese associada com uma doença hiperproliferativa. Por exemplo, bloqueando-se a angiogênese associada ao tumor, o crescimento do tumor pode ser inibido. Em uma forma de realização, o anticorpo liga-se a um RTK

associado ao tumor e inibe a produção de ligandos angiogênicos (isto é, VEGF) pelo tumor, e também liga-se a um receptor VEGF associado com células da vasculatura para inibir a proliferação destas células. Em uma forma de realização diferente, o anticorpo liga-se a receptores VEGF múltiplos, de modo que o ligando de VEGF ou outro ligando de VEGFR (por exemplo, PlGF) é impedido de se ligar a mais do que um tipo de receptor VEGF.

Os tumores que podem ser tratados incluem tumores primários e tumores metastáticos, bem como tumores refratários. Os tumores refratários incluem tumores que falham em responder ou são resistentes a tratamento com agentes quimioterapêuticos sozinhos, anticorpos sozinhos, radiação sozinha ou combinações dos mesmos. Os tumores refratários também englobam tumores que parecem ser inibidos por tratamento com tais agentes, mas reaparecem em até cinco anos, algumas vezes em até dez anos ou mais após o tratamento ser descontinuado. Os tumores podem expressar EGFR ou outro RTK em níveis normais ou podem superexpressar o RTK em níveis, por exemplo, que são pelo menos 10, 100, ou 1000 vezes os níveis normais.

Exemplos de tumores que expressam EGFR e são estimulados por um ligando de EGFR incluem carcinomas, gliomas, sarcomas, adenocarcinomas, adenosarcomas, e adenomas. Estes tumores podem ocorrer virtualmente em todas as partes do corpo, incluindo, por exemplo, mama, coração, pulmão, intestino delgado, cólon, baço, rim, bexiga, cabeça e pescoço, ovário, próstata, cérebro, pâncreas, pele, osso, medula óssea, sangue, timo, útero, testículos, colo do útero ou fígado. Alguns tumores que foram observados como superexpressando EGFR que podem ser tratados de acordo com a presente invenção incluem, mas não estão limitados a, tumores colorretais e de cabeça e pescoço, especialmente carcinoma de células escamosas de cabeça e pescoço, tumores do cérebro como glioblastomas, e tumores do pulmão, mama, pâncreas, esôfago, bexiga, rim, ovário, colo do útero e próstata. Exemplos não limitativos de tumores que tem, como observado,

atividade de receptor tirosina quinase constitutivamente ativa (isto é, não regulados) incluem gliomas, carcinomas de pulmão de células não pequenas, carcinomas de ovário e carcinomas de próstata. Outros exemplos de tumores incluem sarcoma de Kaposi, neoplasmas do sistema nervoso central, neuroblastomas, hemangioblastomas capilares, meningiomas e metástase cerebral, melanoma, carcinomas gastrintestinal e renal e sarcomas, rabdiosarcoma, glioblastoma, preferivelmente glioblastoma multifórmico, e leiomiomasarcoma. A superexpressão de outros RTKs pode produzir defeitos de crescimento similares. Por exemplo, cânceres ósseos mais metastáticos surgem a partir de tumores primários de próstata, mama, ou pulmão. Tumores de próstata inicialmente podem ser dependentes de hormônio, mas a perda desta dependência coincide com estímulo mediado por IGFR de células que migram para os ossos.

Os anticorpos também são utilizáveis para tratamento das doenças hiperproliferativas diferentes de tumores compreendendo a administração ao mamífero de uma quantidade eficaz do anticorpo da presente invenção. Como descrito aqui, “doença hiperproliferativa” é definida como uma condição causada por crescimento excessivo de células não cancerosas que expressam um membro da família EGFR ou outros receptores citosina quinase. O excesso de células geradas por uma doença hiperproliferativa expressa o RTK em níveis normais ou podem superexpressar o RTK.

Exemplos de doença hiperproliferativa incluem psoríase, queratoses actínicas e queratoses seborreicas, verrugas, cicatrizes quelóides, e eczema. Também estão incluídas as doenças hiperproliferativas causadas por infecções virais, como infecção com papilomavírus. Por exemplo, psoríase ocorre em variações e graus de severidade muito diferentes. Tipos diferentes de psoríase exibem características como bolhas com pus (psoríase pustular), escara severa da pele (psoríase eritrodérmica), pontos semelhantes gotas

(psoríase gutata) e lesões inflamadas lisas (psoríase inversa). O tratamento de todos os tipos de psoríase (por exemplo, psoríase vulgaris, psoríase pustulosa, psoríase eritrodérmica, psoríase artropática, parapsoríase, pustulose palmoplantar) é contemplado pela invenção.

5 De acordo com a invenção, os anticorpos podem ser quimicamente ou biossinteticamente conjugados a outros agentes como agentes antineoplásicos ou antiangiogênicos para tratamento de doença. Agentes antitumor ligados a um anticorpo incluem quaisquer agentes que destroem ou danificam um tumor ao qual o anticorpo se ligou ou no meio da
10 célula em que o anticorpo se ligou. Por exemplo, um agente antitumor é um agente tóxico como um agente quimioterapêutico ou um radioisótopo. Os agentes quimioterapêuticos são conjugados ao anticorpo usando métodos convencionais (Ver, por exemplo, Hermentin e Seiler (1988) *Behring Inst. Mitt.* 82, 197-215), incluindo ligadores peptídeo e não peptídeo.

15 Anticorpos da invenção também podem ser ligados a agentes produtores de sinal detectável utilizáveis *in vivo* e *in vitro* para fins de diagnóstico. O agente produtor de sinal produz um sinal mensurável que é detectável por meios externos, geralmente a medição de radiação eletromagnética. Para a maior parte, o agente produtor de sinal é uma enzima
20 ou cromóforo, ou emite luz por fluorescência, fosforescência ou quimiluminescência. Os cromóforos incluem corantes que absorvem luz na região de ultravioleta ou visível, e podem ser substratos ou produtos de degradação de reações catalisadas por enzima.

A invenção ainda contempla o uso de anticorpos com agentes
25 diagnósticos ou tratamento incorporados em reagentes secundários. Por exemplo, um membro de um par de ligação é ligado ao anticorpo da invenção. Agentes antineoplásicos, por exemplo, são conjugados a segundos membros destes pares e são, assim, dirigidos ao sítio onde o anticorpo é ligado. Em uma forma de realização preferida, biotina é conjugada a um anticorpo da

invenção, e deste modo provê um alvo para um agente antineoplásico ou outra porção que é conjugada a avidina ou estreptavidina. Além disso, biotina ou uma outra tal porção é ligada a um anticorpo da invenção e usada como um repórter, por exemplo em um sistema diagnóstico onde um agente produtor de
5 sinal detectável é conjugado a avidina ou estreptavidina.

Anticorpos podem ser administrados em combinação com um ou mais adjuvantes apropriados, como, por exemplo, citocinas (IL-10 e IL-13, por exemplo) ou outros estimulantes imunes, como, mas não limitados a quimioquina, antígenos associados a tumor, e peptídeos. Deve-se notar, no
10 entanto, que a administração de um anticorpo sozinho é suficiente para prevenir, inibir ou reduzir a progressão do tumor de um modo terapêuticamente efetivo.

Em algumas formas de realização, pode ser desejável administrar um anticorpo da invenção que se liga a um RTK e bloqueia a
15 ligação ao ligando em combinação com uma outra proteína de ligação a antígeno que se liga ao ligando. Os anticorpos de ligação ao ligando são bem conhecidos na técnica e incluem, por exemplo, anti-VEGF (Avastin®; bevacizumab).

Os anticorpos da invenção também devem ser usados em
20 métodos de tratamento combinado por administração com um agente antineoplásico como um agente quimioterapêutico ou um radioisótopo. Agentes quimioterapêuticos apropriados são conhecidos dos versados na técnica e incluem irinotecan (CPT-11), antraciclinas (por exemplo, daunomicina e doxorubicina), metotrexato, vindesina, neocarzinostatina,
25 cisplatina, clorambucila, citosina arabinosida, 5-fluorouridina, melfalan, ricina e calicheamicina. Um anticorpo e um agente antiangiogênico ou antineoplásico são administrados a um paciente em quantidades eficazes para inibir a angiogênese e/ou reduzir o crescimento de tumor. Os anticorpos também devem ser administrados em combinação com outros regimes de

tratamento, por exemplo, com tratamentos como terapia de radiação. Para exemplos de terapias em combinação, ver, por exemplo, patente US 6.217.866 (Schlessinger et al.) (anticorpos anti-EGFR em combinação com agentes antineoplásicos); WO 99/60023 (Waksal et al.) (anticorpos anti-EGFR em combinação com radiação).

Qualquer agente antineoplásico apropriado pode ser usado, como um agente quimioterapêutico, radiação ou combinação dos mesmos. Os agentes antineoplásicos conhecidos na técnica ou sendo avaliados podem ser agrupados em classes com base em seu alvo ou modo de ação. Por exemplo, agentes alquilantes incluem, mas não estão limitados a cisplatina, ciclofosfamida, melfalan e dacarbazina. Exemplos de antimetabólitos incluem, mas não estão limitados a doxorubicina, daunorrubicina e paclitaxel, gencitabina, e inibidores de topoisomerase irinotecan (CPT-11), aminocamptotecina, camptotecina, DX-8951f, e topotecan (topoisomerase I) e etoposida (VP-16) e tenoposida (VM-26) (topoisomerase II). Para a radiação, a fonte pode ser tanto externa (terapia de radiação de feixe externo – EBRT) ou interna (braquiterapia – BT) ao paciente sendo tratado. Estas classificações podem ser utilizáveis para escolher um uso do agente antineoplásico. Por exemplo, observa-se que os anticorpos que ligam IGFR podem ser particularmente efetivos quando administrados com um inibidor de topoisomerase.

A dose do agente antineoplásico administrado depende de numerosos fatores, incluindo, por exemplo, o tipo de agente, o tipo e severidade do tumor sendo tratado e a via de administração do agente. Deve ser enfatizado, no entanto, que a presente invenção não está limitada a qualquer dose particular.

Em uma terapia de combinação, o anticorpo é administrado antes, durante, ou após o início da terapia com um outro agente, bem como qualquer combinação do mesmo, isto é, antes e durante, antes e após, durante a

após, ou antes, durante e após iniciar a terapia com agente antineoplásico. Por exemplo, para tratamento de um tumor ou doença neoplásica, o anticorpo pode ser administrado entre 1 e 30 dias, preferivelmente 3 e 20 dias, mais preferivelmente entre 5 e 12 dias antes de iniciar a terapia de radiação. Em
5 uma forma de realização preferida da invenção, quimioterapia é administrada simultaneamente com, antes de, ou subsequente à terapia com anticorpo.

Na presente invenção, qualquer via ou método apropriado pode ser usado para administrar os anticorpos da invenção e, opcionalmente, co-administrar os agentes antineoplásicos, antagonistas de receptor, ou outra
10 composição farmacêutica. Por exemplo, regimes de agentes antineoplásicos utilizados de acordo com a invenção incluem qualquer regime que se acredita ser otimamente apropriado para o tratamento de uma condição neoplásica do paciente. Malignidades diferentes podem requerer o uso de anticorpos antitumor específicos e agentes antineoplásicos específicos que serão
15 determinados em uma base de paciente para paciente. As vias de administração incluem, por exemplo, administração oral, intravenosa, intraperitoneal, subcutânea ou intramuscular. A dose do agente antineoplásico administrado depende de numerosos fatores, incluindo, por exemplo, o tipo de agente neoplásico, o tipo e severidade do tumor sendo tratado e da via de
20 administração do agente antineoplásico. Deve ser enfatizado, no entanto, que a presente invenção não está limitada a qualquer método ou via particular de administração.

Entende-se que os anticorpos da invenção, quando usados em um mamífero para o fim de profilaxia ou tratamento, serão administrados na
25 forma de uma composição compreendendo adicionalmente um veículo farmacêuticamente aceitável. Veículos farmacêuticamente aceitáveis apropriados incluem, por exemplo, um ou mais de água, solução salina, solução salina tamponada com fosfato, glicerol, etanol e outros, bem como combinações dos mesmos. Veículos farmacêuticamente aceitáveis podem

ainda compreender quantidades menores de substâncias auxiliares como agentes umectantes ou emulsificantes, conservantes ou tampões, que melhoram a vida em prateleira ou efetividade das proteínas de ligação. As composições da invenção podem, como conhecido na técnica, ser formuladas de modo a prover uma liberação sustentada ou retardada, rápida, do ingrediente ativo após a administração ao mamífero.

A presente invenção também inclui kits para inibir o crescimento de tumor e/ou angiogênese, ou tratar outras doenças, compreendendo uma quantidade terapêuticamente eficaz de um anticorpo da invenção. Anticorpos humanos ou humanizados são preferidos. Os kits podem ainda conter qualquer antagonista apropriado de, por exemplo, um outro receptor de fator de crescimento envolvido em tumorigênese ou angiogênese (por exemplo, EGFR, VEGFR, VEGFR-1/Flt-1, VEGFR-2/Flk-1/KDR, IGFR, PDGFR, NGFR, FGFR, etc., como descrito acima). Alternativamente, ou além disso, os kits da presente invenção podem ainda compreender um agente antineoplásico. Exemplos de agentes antineoplásicos apropriados no contexto da presente invenção são descritos aqui. Os kits da presente invenção podem ainda compreender um adjuvante; exemplos também são descritos acima.

Também está incluído dentro do escopo da presente invenção o uso dos anticorpos da presente invenção *in vivo* e *in vitro* para métodos de investigação ou de diagnóstico, que são bem conhecidos na técnica. Os métodos de diagnóstico incluem kits que contêm os anticorpos da presente invenção.

Portanto, os presentes anticorpos de ligação a receptor podem, assim, ser usados *in vivo* e *in vitro* para métodos de investigação, de diagnóstico, de profilaxia ou de tratamento, que são bem conhecidos na técnica. Naturalmente, deve ser entendido e esperado que variações dos princípios da invenção aqui descrita podem ser feitas por um versado na

técnica e pretende-se que estas modificações devem ser incluídas dentro do escopo da presente invenção. Todas as referências mencionadas aqui são incorporadas por referência em sua totalidade.

EXEMPLOS

5 Os seguintes exemplos ainda ilustram a invenção, mas não devem ser considerados como limitando o escopo da mesma de modo algum. Descrições detalhadas de métodos convencionais, como os empregados na construção de vetores e plasmídeos, a inserção de genes codificando polipeptídeos em tais vetores e plasmídeos, a introdução de plasmídeos em
10 células hospedeiras, e a expressão e determinação dos mesmos de genes e produtos de genes podem ser obtidos a partir de numerosas publicações, incluindo Sambrook , J. et al., (1989) Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2^a. Edição, Cold Spring Harbor Laboratory Press; e Coligan, J. et al. (1994) Current Protocols in Immunology, Wiley & Sons, Incorporated.

15 **Seleção de anticorpos anti-mPDGFR α humano de biblioteca Fab de exibição de fago.** Uma biblioteca de exibição de fagos Fab humano nativo extensa de Dyax (contendo $3,7 \times 10^{10}$ clones) foi usada para selecionar anticorpos dirigidos contra proteína mPDGFR α -Fc (R&D Systems (Minneapolis, MN). O lote da biblioteca (100 μ l) foi cultivado na fase log em
20 20 ml de meio 2YTAG, recuperado com fago auxiliar M13K07, e amplificada durante a noite em meio 2YTAK (2YT contendo 100 μ g/ml de ampicilina e 50 μ g/ml de canamicina) a 30°C. As preparações de fago foram precipitadas em 4% de PEG, NaCl 0,5 M. As preparações de fago foram recolocadas em suspensão em 1 ml de leite desnatado a 3%/PBS contendo 240 μ g de IgG não
25 relacionada e incubadas a 37°C durante 1 h para bloquear a ligação não específica e a ligação à etiqueta Fc da proteína mPDGFR α .

Três ciclos de seleção foram realizados em mPDGFR α -Fc com quantidades decrescentes de proteína (50, 10 e 2 μ g, respectivamente) revestidas em tubos de seleção. Para cada ciclo de seleção, tubos Maxisorp

Star revestidos com mPDGFR α -Fc (Nunc, Roskilde, Denmark) foram primeiro bloqueados com 3% de leite/PBS a 37 °C durante 1 h, e então incubados com a preparação de fago em temperatura ambiente durante 1 h. Os tubos foram lavados 15 vezes com PBST (PBS contendo 0,1% de Tween 20) seguido por 15 lavagens com PBS. O fago ligado foi eluído em temperatura ambiente durante 10 min com 1 ml de uma solução recentemente preparada de trietilamina 100 mM (Sigma). O fago eluído foi incubado com 10 ml de células TG1 de fase meio-log a 37 °C durante 30 min estacionários e 30 min em agitação. As células TG1 infectadas foram granuladas, depositadas em três placas 2YTAG, e incubadas durante a noite a 30°C. Todas as colônias cultivadas nas placas foram raspadas em 3-5 ml de meio 2YTA, misturadas com glicerol (concentração final: 10%), divididas em alíquotas e armazenadas a -80°C. Para ciclos subsequentes de seleção, o lote de fagos (100 μ l) do ciclo anterior de seleção foi amplificado e usado para seleção após o procedimento descrito acima com quantidade diminuída de mPDGFR α /Fc para revestir os tubos Maxisorp Star.

Para estimar os fagos de entrada, 10 μ l de fagos antes da seleção foram usados para infectar as células TG1, e então titulados em placas 2YTAG. Para estimar a recuperação de fago da seleção, 10 μ l de células infectadas TG1 com fago eluído, do procedimento de seleção acima, foram titulados em placas 2YTAG. Os rendimentos de recuperação para cada ciclo de seleção foram calculados e aumentados nos ciclos sucessivos (primeiro ciclo, 1x10%; segundo ciclo, 4x10⁻⁶%; terceiro ciclo, 2 x 10⁻⁴%) apesar de ser diminuído o revestimento com mPDGFR α /Fc.

Triagem ELISA para anticorpos com atividades de ligação e de bloqueio. Após os 2^o e 3^o ciclos de seleção, 190 clones de cada ciclo foram selecionados aleatoriamente e testados para atividades de ligação e de bloqueio por tanto ELISA de fagos como ELISA de Fabs. Brevemente, os clones de TG1 recuperados após os 2^o e 3^o ciclos de seleção foram

selecionados aleatoriamente e cultivados a 37 °C em placas de 96 cavidades. Para produzir os fagos, as células foram resgatadas com o fago auxiliar M13K07 como descrito acima. Para produzir Fab solúvel, as células foram incubadas em meio 2YTA contendo 1 mM de IPTG. Para o ELISA de ligação, as preparações de fagos e os sobrenadantes de cultura de células contendo Fab solúvel foram bloqueadas com 1/6 volume de 18% de leite/PBS em temperatura ambiente durante 1 h. A preparação de fagos bloqueados ou sobrenadantes de cultura de células foram então adicionados a placas de microtitulação de 96 cavidades (Nunc) revestidas com mPDGFR α /Fc (1 μ g/ml, 50 μ l, a 4°C durante a noite), e incubados em temperatura ambiente durante 1 h. Após incubação em temperatura ambiente durante 1 h, as placas foram lavadas 3 vezes com PBST.

Para o ELISA de fagos, as placas foram incubadas com um conjugado anticorpo-HRP de fago anti-M13 (Amersham Biosciences). Para o ELISA de Fab, as placas foram incubadas com um conjugado anticorpo-HRP de Fab anti-humano (Jackson ImmunoResearch Laboratory). Após três lavagens, a cor foi revelada pela adição de substrato TMB peroxidase (KPL, Gaithersburg, MD), e a absorbância foi medida a 450 nM usando uma leitora de microplaca (Molecular Device, Sunnyvale, CA). ELISAs para ligação a IgG 1C11 também foram realizados para eliminar os anticorpos específicos Fc identificados como aglutinantes na triagem de biblioteca. Mais do que 77% dos clones selecionados após a 2^a seleção, e 99% dos clones recuperados após a 3^a edição eram positivos em teste de ligação a mPDGFR α , sugerindo uma alta eficiência do processo de seleção.

Para o ELISA de bloqueio, preparações de 50 μ l de fagos ou sobrenadantes de cultura de Fabs foram misturadas com uma quantidade fixa de mPDGFR α -Fc (0,5 μ g/ml) e incubadas em temperatura ambiente durante 30 min. A mistura foi então transferida para placas de 96 cavidades pré-revestidas com rhPDGF-AA (0,5 μ g/ml; R&D Systems, Minneapolis, MN) e

incubada em temperatura ambiente durante 1 h. Para quantificar a proteína de mPDGFR α -Fc ligada, as placas foram então incubadas em temperatura ambiente durante 1 h com um conjugado anticorpo-HRP anti-humano-Fc de coelho, seguido por três lavagens e adição do substrato de TMS peroxidase. A

5 proteína mPDGFR α -Fc ligada foi quantificada por leitura da absorbância a 450 nM. A atividade de bloqueio foi indicada por sinal de ELISA diminuído detectado por conjugado anticorpo-HRP anti-humano-Fc. Cerca de 4,2% dos clones que ligaram mPDGFR α mostraram atividade de bloqueio de PDGF-AA.

10 Com base nos resultados de testes de bloqueio, 14 clones, incluindo um aglutinante de não-bloqueio como um clone de controle (3F3), foram inicialmente selecionados para outro estudo. DNAs de fagemídio foram isolados e as seqüências de DNA foram determinadas por sequenciamento de dideoxinucleotídeos. A classificação e alinhamentos de genes VH e VL foram

15 realizados usando o sítio da web Bioinformatics de Andrew C.R. Martin's Bioinformatics Group (www.bioinf.org.uk) e MagAlign de DNASTar.

Análise de anticorpos anti- mPDGFR α selecionados.

Dentre os 14 clones, 9 anticorpos distintos foram revelados (Tabela 1). Além de IC10 e IF2, não foram encontrados V_{HS} ou V_{LS} idênticos.

20 Interessantemente, quatro dos anticorpos com atividade de bloqueio mais forte tinham cadeias leves incompletas. Os clones IF2 e IF9 tinham deleções de V_L na armação (seqüência de peptídeos líder seguida por seqüência de C_L). Os clones 1C10 e 1F2 compartilharam o mesmo gene V_H. No entanto, uma vez que a seqüência de IC10 codificando V_L incluía um códon de parada, este

25 C_L não foi expressado. O clone 3G7 incluindo um códon de parada apareceu na extremidade 5' do gene V_L. Tanto 1C10 como 3G7 demonstraram um forte bloqueio. A expressão de Fab e atividade de ligação pareceram ser muito baixas, mas podem ser levadas em conta pela fraca ligação do reagente secundário de Fab anti-humano.

Tabela 1 – Anticorpos anti- mPDGFR α de uma biblioteca de exibição de fagos Fabs						
Clone	Subgrupo V _H	Subgrupo V _L	CL	Ligação	Bloqueio	Expressão de Fab
1C10	I	κ II	-	\pm	++	\pm
1F2	I	-	+	+++	+++	++
1F9	I	-	+	++	++	++
3G7	I	-	-	\pm	++	\pm
1A11	II	κ II	+	+++	+	+
1E10	II	κ III	+	++	+	+
3B2	III	κ III	+	++	+	+++
3B9	III	κ III	+	++	+	++
3F3	III	κ III	+	+++	-	+++

Seqüências de nucleotídeos e de aminoácidos para os Fabs são como a seguir: domínio V_H de 1E10: SEQ ID Nos: 51 e 52; domínio V_L de 1E10: SEQ ID Nos: 53 e 54; domínio V_H de 1A12: SEQ ID Nos: 55 e 56; domínio V_L de 1A12: SEQ ID Nos: 57 e 58; domínio V_H de 3B2: SEQ ID Nos: 59 e 60; domínio V_L de 3B2: SEQ ID Nos: 61 e 62; domínio V_H de 1C10: SEQ ID Nos: 63 e 64; domínio V_L de 1C10: SEQ ID Nos: 65 e 66; domínio V_H de 3G7: SEQ ID Nos: 67 e 68; seqüência de nucleotídeos do domínio V_L de 3G7: SEQ ID No: 69; domínio V_L de 3G7: QAW; domínio V_H de 1F9: SEQ ID Nos: 70 e 71; domínio V_L de 1F9: SEQ ID Nos: 72 e 73; domínio V_H de 1F2: SEQ ID Nos: 74 e 75; domínio V_L de 1F2: SEQ ID Nos: 76 e 77. A figura 15 mostra cada um dos domínios (incluindo as truncagens de V_L ou deleções de 3G7, 1F9 e 1F2) e as localizações das regiões de CDR.

Os fragmentos Fab de seis clones foram expressados em células hospedeiras HB2151 de *E. Coli*, e purificados pela coluna G de proteína por cromatografia de afinidade. Os fagemídeos dos clones selecionados individuais foram usados para transformar uma HB2151 de hospedeiro de *E. Coli* não supressor. A expressão de fragmentos Fabs em HB2151 foi induzida cultivando as células em meio 2YTA contendo 1 mM de IPTG a 30°C. Um extrato periplasmático das células foi preparado como

descrito por Lu (x). A proteína de Fab solúvel foi purificada usando uma coluna de proteína G seguindo o protocolo do fabricante (Amersham Biosciences). Para examinar a pureza e o peso molecular da preparação, os anticorpos purificados foram submetidos a eletroforese em 4-12% de gel Bis-Tris NuPAGE™ (Invitrogen) e visualizados por coloração com a solução de SimplyBlue™ SafeStain (Invitrogen).

As proteínas de ligação purificadas foram analisadas por SDS-PAGE (figura 2). Fabs com cadeias leves completas aparecem na figura 2A com pesos moleculares de cerca de 50.000. Em contraste, fragmentos não reduzidos de 1F2 e 1F9 deram bandas pequenas (-DTT: MW ~ 37.500) como comparado com um Fab de controle padrão (figura 2B). Em condições de redução (+DTT), duas bandas foram evidentes, a banda superior consistente com o tamanho normal de fragmentos VH=CH1, e as bandas inferiores consistentes com cadeias leves tendo fragmentos CL (MW ~ 12.500) mas faltando os domínios variáveis.

Ligação de mPDGFR α e bloqueio de mPDGFR α / PDGF-AA por anticorpos anti-mPDGFR α . Fragmentos Fabs solúveis de seis clones anti- mPDGFR α foram comparados quantitativamente em sua eficiência de ligação a antígeno e potência par bloquear a interação de mPDGFR α / PDGF-AA. No teste de ligação, o Fab foi primeiro incubado em uma placa de 96 cavidades pré-revestida com proteína de fusão mPDGFR α /Fc (1 μ g/ml) em temperatura ambiente durante 1 h, seguido por incubação com um conjugado anticorpo-HRP Fab anti-anti-humano de coelho durante mais 1 h. O anticorpo-HRP ligado à placa foi então quantificado pela adição de substrato de peroxidase. Consistente com o resultado da triagem inicial (tabela 1), Fab 1F2 liga-se muito mais eficientemente a mPDGFR α do que todas as outras proteínas Fab (figura 3A).

A cinética de ligação de vários anticorpos anti- mPDGFR α foi determinada por ressonância de plasmon de superfície usando um biossensor

BIAcore 3000 e avaliada usando o programa BIA Evaluation 2.0 (Biacore, Inc., Uppsala, Suécia). A constante de afinidade, K_d , foi calculada a partir da relação da taxa de dissociação ($k_{desligado}$)/ taxa de associação (k_{ligado}). Os valores descritos representam a média \pm desvio padrão, de pelo menos duas determinações para Fabs e três determinações para IgG. (Tabela 2). Consistente com os testes de ligação, o anticorpo sVD 1F2 tem afinidade muito maior (K_d) de cerca de 0,5 nM, mais do que 23 vezes mais alta do que o Fab normal selecionado, 1E10.

Na tabela 2, Fab 1F2-2H é um Fab divalente engenheirado contendo um segundo domínio VH idêntico expressado como uma fusão para CL. O Fab divalente foi expressado em *E. coli* e purificado por cromatografia de proteína G. Análise SDS-PAGE do Fab 1F2-2H purificado demonstrou uma banda de proteína única de aproximadamente 50 kD, similar à do fragmento Fab padrão (figura 5). A afinidade do Fab divalente é 79,5 pM, comparado a 418 pM para o Fab 1F2 monovalente, indicando uma melhora de 5,2 vezes (tabela 2).

Anticorpo	Kligado (1/Ms)	Kdesligado (1/s)	Kd (M)
Fab 1F2	$9,17 \pm 4,15 \times 10^5$	$3,13 \pm 0,76 \times 10^{-4}$	$4,18 \pm 2,07 \times 10^{-10}$
Fab 1F9	$1,75 \pm 0,45 \times 10^6$	$3,20 \pm 0,4 \times 10^{-3}$	$2,05 \pm 0,75 \times 10^{-9}$
Fab 1E10	$1,75 \pm 0,05 \times 10^5$	$2,05 \pm 0,55 \times 10^{-3}$	$1,22 \pm 0,20 \times 10^{-8}$
Fab 1F2-2H	$9,35 \pm 7,65 \times 10^6$	$1,40 \pm 0,50 \times 10^{-4}$	$7,95 \pm 0,55 \times 10^{-11}$
1F2-CL	$2,33 \pm 0,31 \times 10^6$	$6,03 \pm 1,59 \times 10^{-5}$	$2,53 \pm 0,34 \times 10^{-11}$
1F2-CH	$1,50 \pm 0,62 \times 10^6$	$5,37 \pm 1,65 \times 10^{-5}$	$3,93 \pm 0,81 \times 10^{-11}$
1F2-2H	$4,23 \pm 0,05 \times 10^5$	$1,67 \pm 0,05 \times 10^{-4}$	$3,90 \pm 0,82 \times 10^{-10}$
1E10	$1,37 \pm 0,33 \times 10^5$	$1,17 \pm 0,62 \times 10^{-4}$	$8,13 \pm 3,44 \times 10^{-10}$

No teste de bloqueio, várias quantidades de anticorpos foram incubadas com uma quantidade fixa de fusão mPDGFR α /Fc em solução, durante 30 min, e as misturas foram então transferidas para placas de 96 cavidades revestidas com rhPDGF-AA e incubadas durante 1 h. mPDGFR α ligado foi então quantificado por quantificação de Fc-Ab anti-humano ligado.

O Fb 1F2 bloqueou fortemente a interação de mPDGFR α /PDGF-AA (figura 3B), com o valor IC₅₀ de 12 nM, comparado com 57, 140 e 220 nM para 1F9, 1E10 e 1A11, respectivamente. Em uma base molar igual, o Fab divalente mostrou uma atividade moderadamente melhorada tanto na ligação a mPDGFR α como no bloqueio da interação receptor/ligando (figura 6).

Clonagem, expressão e purificação de IgG completa. Fabs de clones selecionados foram convertidos em IgGs de comprimento completo clonando os domínios VH e VL no vetor de expressão de cadeia pesada, pDFc, e vetor de expressão de cadeia leve, pLCK, respectivamente. O pDFc tem sítios de clonagem *Hind* III e *Nhe* I entre os genes de codificação de uma seqüência de peptídeo líder e CH1. O pLCK tem sítios de clonagem *Hind* III e *Bsi*W I entre uma seqüência de peptídeo líder e CL. Brevemente, os genes de codificação de VH e VL foram amplificados por PCR de transcrição reversa de DNAs fagemídeos e clonados em seus respectivos vetores de expressão. Os vetores de expressão de cadeia pesada e cadeia leve (VH-pDFc e VL-pLCK) foram então co-transfectados em células COS-7 para expressão transiente como anteriormente descrito. Os meios de cultura de células foram coletados em 48 e 96 horas após a transfecção, e reunidos. Os anticorpos foram purificados do sobrenadante de culturas de células por cromatografia de afinidade usando colunas de proteína A seguindo o protocolo do fabricante (Amersham Biosciences). Após a função de IgG ser confirmada, os pares expressados de genes VH e VL foram clonados em vetores de expressão únicos e transfectados em células COS-7. A purificação dos anticorpos foi como descrito acima.

Três construções de tipo IgG foram produzidas a partir de Ig 1F2 que contém somente um VH (ver figura 7), incluindo IgG de IF2-2H tetravalente com quatro V_{HS} (A), e IF2 divalente com V_H de 1F2 expressado como uma fusão tanto a C_H como a C_L (B e C). Os plasmídeos para expressar as cadeias leves e pesadas foram usados para co-transfectar as células COS-7

para expressão transiente. Os níveis de expressão dos anticorpos foram monitorados por ELISA usando os sobrenadantes de culturas de células. A expressão de 1F2-2H foi consistentemente menor do que ambos os anticorpos 1F2 divalentes, cerca de um quarto de anticorpos 1F2 divalentes. Os anticorpos do sobrenadante de culturas de células foram purificados por cromatografia de afinidade usando uma coluna de proteína A.

Clone 1E10, um bloqueador com componentes de anticorpos normais, também foram convertidos em uma IgG de comprimento completo. Os genes de V_H e V_L de 1E10 foram primeiro clonados em pDFc e pLCk, respectivamente. Como acima, após sequenciamento de DNA e confirmação da atividade de ligação a IgG de 1E10, o par V_H/V_L expressado foi clonado em um vetor de expressão único que foi então usado para transfectar as células COS-7 seguido por purificação de anticorpos.

Anticorpos purificados foram analisados por SDS-PAGE para determinar a pureza e o peso molecular da preparação. Os anticorpos divalentes 1F2-CH/CL e 1F2-CL/CH, com MW ~ 125.000, migraram mais rápido do que a IgG normal (1E10 e 2B4; painel à esquerda da figura 8). Quando os anticorpos foram tratados com DTT antes de eletroforese (painel à direita da figura 8), os componentes de cadeias pesadas e leves foram resolvidos. O anticorpo 1F2-CH/CL tinha uma banda superior correlacionada com uma cadeia pesada similar à de 1E10 e 2B4, e uma banda inferior migrando rápido com uma mobilidade próxima à antecipada (MW ~ 12.500, somente CL). O anticorpo 1F2-CL/CH, por outro lado, mostrou que a banda inferior representa uma cadeia leve com mobilidade similar à de 1E10 e 2B4, e a banda superior correlaciona com o polipeptídeo C_H1 -Fc somente (MW ~ 37.500).

Atividades de ligação e de bloqueio dos anticorpos anti-mPDGFR α de comprimento completo. Todos os três anticorpos variantes de 1F2 purificados, 1F2-2H, 1F2-CH/CL e 1F2-CL/CH e o anticorpo 1E10

foram comparados para sua afinidade de ligação a mPDGFR α por ELISA. Várias quantidades de anticorpos foram incubadas na placa de ELISA revestida com mPDGFR α /Fc, anticorpos ligados a mPDGFR α foram então detectados por um conjugado anticorpo HRP anti-humano- κ . O resultado de ELISA indica que ainda que IgG 1F2-2H tenha quatro sítios de ligação, a atividade de ligação de IF2-2H foi $\sim 8x$ mais baixa do que ambos os IgGs de 1F2 divalentes (1F2-CH/CL e 1F2-CL/CH (figura 9A). Por outro lado, ambos os 1F2 divalentes (1F2-CH/CL) e 1F2-CL/CH) tiveram afinidade de ligação muito similar mostrada por ELISA (figura 9A) e análise BIAcore (tabela 2). A afinidade de IgG 1F2 divalente aumentou em cerca de uma grandeza a partir de Fab de 1F2 parental e IgG de 1E10 aumentou 20 vezes de seu Fab (tabela 2). No todo, as afinidades de ligação de ambos IgGs de 1F2 divalentes em mPDGFR α foram cerca de uma grandeza maior do que IgG de 1E10 (figura 9A e tabela 2).

Testes de bloqueio quantitativos também foram realizados para avaliar os anticorpos anti- mPDGFR α . Como descrito acima, várias quantidades de anticorpos foram incubadas com uma quantidade fixa de fusão de mPDGFR α /Fc em solução, durante 30 min, e as misturas foram então transferidas para placas de 96 cavidades revestidas com rhPDGF-AA e incubadas durante 1 h. mPDGFR α ligado foi então quantificado por quantificação de Fc-Ab anti-humano ligado. Consistente com os dados de ligação, os 1F2-CH/CL e 1F2-CL/CH divalentes foram melhores bloqueadores do que IgG de 1F2-2H e IgG de 1E10: os valores IC₅₀ foram 3,2, 2,7, 17, e 9,6 nM, para 1F2-CH/CL, 1F2-CL/CH, IgG de 1F2-2H e IgG de 1E10, respectivamente (figura 9B).

Anticorpos biespecíficos. Um anticorpo anti-Flk-1, 2B4, também foi isolado da biblioteca de fagos Fab Dyax usando o mesmo procedimento descrito acima, exceto que os tubos Maxisorp Star foram revestidos com proteína de fusão mVEGFR2-Fc. O Fab de 2B4 foi específico

para Flk-1 e bloqueou a interação Flk-1/VEGF₁₆₅. Os domínios V_H e V_L de Fab de 2B4 são providos pelas SEQ ID Nos: 79 e 81, respectivamente. A figura 15 mostra cada um dos domínios e as localizações das regiões de CDR. O Fab de 2B4 foi convertido em IgG1 completo como descrito acima. A cinética de ligação de Fab de 2B4 e IgG foi determinada por análise BIA core. As afinidades de ligação de Fab de 2B4 e IgG para mVEGFR2 são $6,7 \pm 3,0$ nM e $0,39 \pm 0,1$ nM, respectivamente. IgG de 2B4 bloqueia a interação VEGFR2/VEGF₁₆₅ com um valor IC₅₀ de aproximadamente 3,5 nM (figura 13B).

Construção de anticorpos biespecíficos com base nos domínios (anti- mPDGFR α x anti-Flt-1) – Anticorpos biespecíficos com base nos domínios foram construídos em dois formatos, o formato scFv e o formato Fab (figura 10, A e B). No formato scFv, os fragmentos PCR codificando os genes V_H e V_L de 2B4 foram primeiro reunidos usando PCR de sobreposição. O término COOH de V_L de 2B4 foi ligado ao término NH₂ de V_H 2B4 via um ligador de 5 aminoácidos (Ala-Ser-Thr-Lys-Gly, obtidos do terminal N de um domínio CL) (figura 10A). O gene resultante, codificando VL-VH de 2B4, foi então clonado no vetor pDFc via ligação *HindIII/ Nhe I* para expressão da fusão scFv2B4-CH (consistindo de 2B4 VL –2B4 VH – CH1 – CH2 – CH3). O vetor de expressão scFv2B4-CH foi então formado em pares com o vetor de expressão 1F2VH-CL como descrito acima por co-transfecção de células COS-7 para expressão transiente.

No formato Fab, o gene V_H de 1F2 e o V_L de 2B4 foram primeiro reunidos usando PCR de sobreposição. Nesta fusão, o término COOH de V_H 1F2 foi ligado ao término amino de V_L de 2B4 via um ligador de 5 aminoácidos da extremidade 5' de C_H. O gene codificando VH-2B4 VL 1F2 foi então clonado no vetor pLCK via os sítios *Hind III/BsiW* para expressão da proteína de fusão 1F2 VH-2B4 VL-CL. O gene V_H de 2B4 foi clonado no vetor pDFc como descrito acima para expressão de V_H. Os plasmídeos para

expressar cadeias leves e pesadas, formadas em pares como descrito na figura 10B, foram usados para co-transfectar células COS-7 para expressão transiente.

5 Após os clones serem testados por ELISA para atividades de ligação dual, as construções de expressão de Ig foram combinadas em um vetor de expressão único que foi então usado para transfectar as células COS-7 para expressão transiente do IgG projetado. Os anticorpos foram purificados do sobrenadante de culturas de células como descrito acima.

Expressão e purificação de anticorpos biespecíficos com base nos domínios. Os anticorpos 1F2/scFv2B4 e 1F2-2B4 foram produzidos por transfecção e expressão transiente em células COS-7 (100-200 ml de culturas de células). Os anticorpos foram purificados dos sobrenadantes de culturas de células por cromatografia de afinidade usando colunas de proteína A.

15 Anticorpos biespecíficos purificados (1F2/scFv e 1F2-2B4) e seus anticorpos parentais 1F2 e 2B4 foram analisados por SDS-PAGE (figura 8). A mobilidade inferior dos anticorpos biespecíficos não tratados (-DTT) estava correlacionada com seu peso molecular alto (~ 175,000), como comparado a IgG de 2B4 e 1F2-CH/CL divalente que migraram na posição de peso molecular ~ 125.000. Os dois componentes de cada um de quatro anticorpos foram separadamente resolvidos após tratamento com DTT. Comparando com uma IgG padrão (2B4), a banda inferior do anticorpo biespecífico 1F2/scFv2B4 (a fusão VH-CL) é comparável a uma cadeia leve de IgG padrão. A banda superior está correlacionada com uma proteína de fusão de cadeia pesada de scFv (MW ~ 62.500). Por outro lado, a banda superior de 1F2-2B4 corresponde à cadeia pesada de uma IgG padrão (2B4) e a banda inferior é observada em uma posição esperada para uma fusão de VH-cadeia leve (MW ~ 37.500).

Especificidade dual de anticorpos biespecíficos com base

em domínios. Em um teste de reticulação, o anticorpo 1F2-2B4 biespecífico e os anticorpos 1F2-CH/CL e 2B4 mono-específicos foram primeiro incubados com mPDGFR α ou mVEGFR2 em solução e então transferidos para uma placa de microtitulação revestida com o segundo receptor (mVEGFR2 ou mPDGFR α , respectivamente), seguido por incubação com um anticorpo policlonal rotulado com biotina para o primeiro receptor. Somente o BsAb, mas não IgG de 2B4 mono-específica parental e 1F2-CH/CL, foi capaz de reticular os dois receptores de alvo.

A eficiência de ligação a antígeno dos anticorpos biespecíficos com base nos domínios foi determinada em mPDGFR α imobilizado e Flk-1. ELISA mostrou que o anticorpo biespecífico, 1F2/scFv2B4 e 1F2-2B4, ligou-se a mPDGFR α e Flk-1, mas não tão eficientemente quanto o anticorpo 1F2 parental e 2B4 (figura 12). No entanto, em ambos os casos, a ligação do anticorpo 1F2-2B4 foi levemente mais eficiente comparado com 1F2/scFv2B4. Como esperado, o 2B4 do anticorpo específico de Flk-1 não se liga a mPDGFR α (figura 12A), nem o 1F2 do anticorpo específico de mPDGFR α liga-se a Flk-1 (figura 12B). A cinética de ligação dos anticorpos biespecíficos para mPDGFR α e Flk-1 foi determinada por ressonância de plasmon de superfície usando um instrumento BIAcore (tabela 3). Consistente com as observações de ELISA, o anticorpo 1F2-2B4 tem maior afinidade para tanto mPDGFR α como Flk-1 em comparação com o anticorpo 1F2/scFv2B4.

Anticorpo	Alvo	Kligado (1/Ms)	Kdesligado (1/s)	Kd (M)
Fab de 2B4		$2,0 \pm 0,7E^5$	$1,1 \pm 0,15E^{-3}$	$6,7 \pm 3,0E^{-9}$
IgG de 2B4		$2,6 \pm 0,15E^5$	$1,0 \pm 0,59E^{-4}$	$3,9 \pm 0,90E^{-10}$
1F2/scFv2B4		$1,6 \pm 0,10E^5$	$5,9 \pm 0,15E^{-4}$	$4,0 \pm 0,45E^{-9}$
1F2-2B4		$1,6 \pm 0,40E^5$	$2,4 \pm 0,10E^{-4}$	$1,5 \pm 0,00E^{-9}$
	mPDGFR α			
Fab de 1F2		$9,2 \pm 4,15E^5$	$3,1 \pm 0,76E^{-4}$	$4,2 \pm 2,1E^{-10}$
1F2-CH/CL		$2,0 \pm 0,95E^6$	$6,7 \pm 0,35E^{-5}$	$4,5 \pm 2,35E^{-11}$
1F2/scFv2B4		$5,1 \pm 2,6E^5$	$9,3 \pm 1,75E^{-5}$	$2,2 \pm 0,75E^{-10}$

1F2-2B4		$2,4 \pm 1,5E^5$	$7,0 \pm 2,0E^{-5}$	$4,1 \pm 1,8E^{-10}$
---------	--	------------------	---------------------	----------------------

A figura 13 mostra que ambos os anticorpos específicos inibem mPDGFR α de se ligar a PDGF-AA imobilizado (figura 13A) com IC50 estimado de 9,9 nM e 25,3 nM para 1F2/scFv2B4 e 1F2-2B4, respectivamente. Os anticorpos também bloqueiam Flk-1 de se ligar a VEGF₁₆₅ imobilizado (figura 13B) com o valor IC50 de 9,5 nM e 19,5 nM, respectivamente. Como esperado, 2B4 não teve nenhum efeito sobre a interação de mPDGFR α /PDGF-AA, enquanto 1F2 não teve nenhum efeito sobre a interação Flk-1/VEGF₁₆₅.

Apesar da afinidade de ligação do anticorpo biespecífico ser menor na ligação a mPDGFR α e ligação a VEGFR2 comparado a moléculas bivalentes mono específicas respectivas, 1F2-CH/CL e IgG de 2B4 (tabela 3), quando examinados para ligação a receptores expressados na superfície de células em células eEnd.1 (as células que expressam tanto mPDGFR α como mVEGFR2), o BsAb demonstrou eficiência mais elevada do que qualquer um dos anticorpos bivalentes mono específicos parentais. A intensidade de fluorescência média (MFI) nas células foi de 15,7, 31 e 36,9, para 1F2-CH/CL (ligação a mPDGFR α), IgG de 2B4 (ligação a mVEGFR2) e 1F2-2B4IgG (ligação a mPDGFR α e nVEGFR2), respectivamente.

Inibição da ativação induzida por ligando de mVEGFR2 e mPDGFR. A expressão de mVEGFR2 e mPDGFR α foi demonstrada em células eEnd.1 via análise FACS. As células foram incubadas com IgG de 2B4, 1F2-CH/CL ou IgG de 1F2-2B4 (10 μ g/ml) a 4°C, durante 1 h, seguido por incubação com um anticorpo Fc anti-humano de cabra rotulado com PE (Jackson ImmunoResearch Lab.) durante mais 1 h, e análise em um sistema Guava EasyCyte (Guava Technologies, Inc., Hayward, CA).

Para examinar a fosforilação no receptor, células eEnd.1 foram depositadas em placas de 6 cm e cultivadas a 70-80% de confluência, após o que as células foram lavadas duas vezes em PBS e cultivadas durante a noite

em meio isento de soro. As células foram primeiro incubadas com vários anticorpos a 37 °C durante 30 min, seguido por estímulo com VEGF ou PDGF-AA a 37 °C durante 15 min. As células foram lisadas em tampão de lise (Tris-HCl 50 mM, pH 7,4, NaCl 150 mM, 1% de Triton X-100, EDTA 1 mM, fluoreto de fenilmetilsulfonila 1 mM, Na₃VO₄ 0,5 mM, 1 µg/ml de leupeptina, 1 µg/ml de pepstatina e 1 µg/ml de aprotinina) durante 1 h, seguido por centrifugação do lisado a 12.000 rpm durante 10 min a 4°C. Os receptores foram imunoprecipitados do sobrenadante do lisado de células usando o anticorpo anti- mPDGFR α (eBioscience, San Diego, CA) ou anti- mVEGFR2 (Santa Cruz, Biotech, Santa Cruz, CA), seguido pela adição de 20 µl de pérolas de Pro-A/G-Sepharose (Santa Cruz Biotech). As proteínas de receptor precipitadas foram resolvidas em um gel Nupage Bis-Tris a 4-12% (Invitrogen) e transferidas para uma membrana de difluoreto de polivinilideno. Fosfo-mVEGFR2 e fosfo- mPDGFR α foram detectados no *blot* usando um conjugado anticorpo - HRP anti-fosfo-tirosina (Santa Cruz Biotech). As proteínas de receptor totais carregadas no gel foram testadas com anticorpos em mPDGFR α ou mVEGFR2 (ambos de Santa Cruz Biotech).

Como mostrado na figura 14, o BsAb inibiu a fosforilação estimulada por tanto PDGF como VEGF de receptores mPDGFR α e mVEGFR2, enquanto anticorpos parentais monoespecíficos somente bloquearam a ativação de um receptor único estimulado por seu ligando cognato. Como um controle, o anticorpo anti-EGFR, C225, não teve qualquer efeito sobre a ativação estimulada por ligando de qualquer receptor.

LISTAGEM DE SEQUÊNCIA

<110> ImClone Systems, Inc.
Zhenping, Zhu

<120> Anticorpos Funcionais

<130> 11245/54376

<140> PCT/US07/04051

<141> 2007-02-15

<150> 60/773,994

<151> 2006-02-15

<160> 81

<170> PatentIn versão 3.3

<210> 1

<211> 351

<212> DNA

<213> Mus musculus

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(351)

<400> 1

cag gtc aag ctg cag cag tct ggg gca gag ctt gtg ggg tca ggg gcc 48
Gln Val Lys Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Val Gly Ser Gly Ala
1 5 10 15

tca gtc aaa ttg tcc tgc aca act tct ggc ttc aac att aaa gac ttc 96
Ser Val Lys Leu Ser Cys Thr Thr Ser Gly Phe Asn Ile Lys Asp Phe
20 25 30

tat atg cac tgg gtg aag cag agg cct gaa cag ggc ctg gag tgg att 144
Tyr Met His Trp Val Lys Gln Arg Pro Glu Gln Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45

gga tgg att gat cct gag aat ggt gat tct ggt tat gcc ccg aag ttc 192
Gly Trp Ile Asp Pro Glu Asn Gly Asp Ser Gly Tyr Ala Pro Lys Phe
50 55 60

cag ggc aag gcc acc atg act gca gac tca tcc tcc aac aca gcc tac 240
Gln Gly Lys Ala Thr Met Thr Ala Asp Ser Ser Ser Asn Thr Ala Tyr
65 70 75 80

ctg cag ctc agc agc ctg aca tct gag gac act gcc gtc tat tac tgt 288
Leu Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

aat gca tac tat ggt gac tac gaa ggc tac tgg ggc caa ggg acc acg 336
Asn Ala Tyr Tyr Gly Asp Tyr Glu Gly Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr
100 105 110

gtc acc gtc tcc tca 351
Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 2
 <211> 117
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

<400> 2

Gln Val Lys Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Val Gly Ser Gly Ala
 1 5 10 15

Ser Val Lys Leu Ser Cys Thr Thr Ser Gly Phe Asn Ile Lys Asp Phe
 20 25 30

Tyr Met His Trp Val Lys Gln Arg Pro Glu Gln Gly Leu Glu Trp Ile
 35 40 45

Gly Trp Ile Asp Pro Glu Asn Gly Asp Ser Gly Tyr Ala Pro Lys Phe
 50 55 60

Gln Gly Lys Ala Thr Met Thr Ala Asp Ser Ser Ser Asn Thr Ala Tyr
 65 70 75 80

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

Asn Ala Tyr Tyr Gly Asp Tyr Glu Gly Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr
 100 105 110

Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 3
 <211> 324
 <212> DNA
 <213> Mus musculus

<220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(324)

<400> 3

gac atc gag ctc act cag tct cca gca atc atg tct gca tct cca ggg 48
 Asp Ile Glu Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ile Met Ser Ala Ser Pro Gly
 1 5 10 15

gag aag gtc acc ata acc tgc agt gcc agc tca agt gta agt tac atg 96
 Glu Lys Val Thr Ile Thr Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met
 20 25 30

cac tgg ttc cag cag aag cca ggc act tct ccc aaa ctc tgg att tat 144
 His Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Thr Ser Pro Lys Leu Trp Ile Tyr
 35 40 45

agc aca tcc aac ctg gct tct gga gtc cct gct cgc ttc agt ggc agt 192
 Ser Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser
 50 55 60

gga tct ggg acc tct tac tct ctc aca atc agc cga atg gag gct gaa 240
 Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Arg Met Glu Ala Glu
 65 70 75 80

gat gct gcc act tat tac tgc cag caa agg agt agt tac cca ttc acg 288
 Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Ser Ser Tyr Pro Phe Thr
 85 90 95

ttc ggc tcg ggg acc aag ctg gaa ata aaa cgg gcg 324
 Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Ala
 100 105

<210> 4

<211> 108

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 4

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

Glu Lys Val Thr Ile Thr Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met
 20 25 30

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

Ser Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser
 50 55 60

Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Arg Met Glu Ala Glu
 65 70 75 80

Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Ser Ser Tyr Pro Phe Thr
 85 90 95

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

<210> 5

<211> 348

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(348)

<400> 5

gag gtg cag ctg gtg cag tct ggg gga ggc ctg gtc aag cct ggg ggg 48
 Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly
 1 5 10 15

tcc ctg aga ctc tcc tgt gca gcc tct gga ttc acc ttc agt agc tat 96
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
 20 25 30

agc atg aac tgg gtc cgc cag gct cca ggg aag ggg ctg gag tgg gtc 144
 Ser Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45

tca tcc att agt agt agt agt agt tac ata tac tac gca gac tca gtg 192
 Ser Ser Ile Ser Ser Ser Ser Ser Tyr Ile Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60

aag ggc cga ttc acc atc tcc aga gac aac gcc aag aac tca ctg tat 240
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr
 65 70 75 80

ctg caa atg aac agc ctg aga gcc gag gac acg gct gtg tat tac tgt 288
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95

gcg aga gtc aca gat gct ttt gat atc tgg ggc caa ggg aca atg gtc 336
 Ala Arg Val Thr Asp Ala Phe Asp Ile Trp Gly Gln Gly Thr Met Val
 100 105 110

acc gtc tca agc 348
 Thr Val Ser Ser
 115

<210> 6
 <211> 116
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 6

Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys 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

Ser Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45

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

Thr Val Ser Ser
 115

<210> 7
 <211> 321
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(321)

<400> 7
 gaa att gtg atg aca cag tct cca gcc acc ctg tct ttg tct cca ggg 48
 Glu Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
 1 5 10 15
 gaa aga gcc acc ctc tcc tgc agg gcc agt cag agt gtt agc agc tac 96
 Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Tyr
 20 25 30
 tta gcc tgg tac caa cag aaa cct ggc cag gct ccc agg ctc ctc atc 144
 Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile
 35 40 45
 tat gat tca tcc aac agg gcc act ggc atc cca gcc aga ttc agt ggc 192
 Tyr Asp Ser Ser Asn Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 agt ggg tct ggg aca gac ttc act ctc acc atc agc agc cta gag cct 240
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro
 65 70 75 80
 gaa gat ttt gca act tat tac tgt cta cag cat aac act ttt cct ccg 288
 Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gln His Asn Thr Phe Pro Pro
 85 90 95
 acg ttc ggc caa ggg acc aag gtg gaa atc aaa 321
 Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105

<210> 8
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 8

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

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

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

Tyr Asp Ser Ser Asn Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly
 50 55 60

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

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gln His Asn Thr Phe Pro Pro
 85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105

<210> 9
 <211> 321
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(321)

<400> 9
 gac atc cag atg acc cag tct cca tct tcc gtg tct gca tct ata gga 48
 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Val Ser Ala Ser Ile Gly
 1 5 10 15
 gac aga gtc acc atc act tgt cgg gcg agt cag ggt att gac aac tgg 96
 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Asp Asn Trp
 20 25 30
 tta ggc tgg tat cag cag aaa cct ggg aaa gcc cct aaa ctc ctg atc 144
 Leu Gly Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45
 tac gat gca tcc aat ttg gac aca ggg gtc cca tca agg ttc agt gga 192
 Tyr Asp Ala Ser Asn Leu Asp Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 agt gga tct ggg aca tat ttt act ctc acc atc agt agc ctg caa gct 240
 Ser Gly Ser Gly Thr Tyr Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Ala
 65 70 75 80
 gaa gat ttt gca gtt tat ttc tgt caa cag gct aaa gct ttt cct ccc 288
 Glu Asp Phe Ala Val Tyr Phe Cys Gln Gln Ala Lys Ala Phe Pro Pro
 85 90 95
 act ttc ggc gga ggg acc aag gtg gac atc aaa 321
 Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Asp Ile Lys
 100 105

<210> 10
 <211> 107

<212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 10

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

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

Leu Gly Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45

Tyr Asp Ala Ser Asn Leu Asp Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60

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

Glu Asp Phe Ala Val Tyr Phe Cys Gln Gln Ala Lys Ala Phe Pro Pro
 85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Asp Ile Lys
 100 105

<210> 11
 <211> 348
 <212> DNA
 <213> Mus musculus

<220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(348)

<400> 11

cag gtc aaa ctg cag cag tct ggg gca gag ctt gtc aag cca ggg gcc 48
 Gln Val Lys Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15

tca gtc aag ttg tcc tgc aca gct tct ggc ttc aac att aaa gac acc 96
 Ser Val Lys Leu Ser Cys Thr Ala Ser Gly Phe Asn Ile Lys Asp Thr
 20 25 30

tat ata cac tgg gtg aag cag agc cct gaa cag ggc ctg gag tgg att 144
 Tyr Ile His Trp Val Lys Gln Ser Pro Glu Gln Gly Leu Glu Trp Ile
 35 40 45

gga agg atc gat cct ccg aat gat aat act aaa tat gac ccg aag ttc 192
 Gly Arg Ile Asp Pro Pro Asn Asp Asn Thr Lys Tyr Asp Pro Lys Phe
 50 55 60

cag ggc aag gcc act ata aca gca gac aca tcc tcc aat aca gcc tac 240
 Gln Gly Lys Ala Thr Ile Thr Ala Asp Thr Ser Ser Asn Thr Ala Tyr
 65 70 75 80

atg cag ctc cgc agc ctg aca tct gag gac act gcc gtc tat tac tgt 288
 Met Gln Leu Arg Ser Leu Thr Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95

gcc ctc cca ccg ttc tac ttt gac tac tgg ggc cat ggc acc acg gtc 336
 Ala Leu Pro Pro Phe Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly His Gly Thr Thr Val
 100 105 110

acc gtc tcc tca 348
 Thr Val Ser Ser
 115

<210> 12
 <211> 116
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

<400> 12

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

Ser Val Lys Leu Ser Cys Thr Ala Ser Gly Phe Asn Ile Lys Asp Thr
 20 25 30

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

Gly Arg Ile Asp Pro Pro Asn Asp Asn Thr Lys Tyr Asp Pro Lys Phe
 50 55 60

Gln Gly Lys Ala Thr Ile Thr Ala Asp Thr Ser Ser Asn Thr Ala Tyr
 65 70 75 80

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

Ala Leu Pro Pro Phe Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly His Gly Thr Thr Val
 100 105 110

Thr Val Ser Ser
 115

<210> 13
 <211> 327
 <212> DNA
 <213> Mus musculus

<220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(327)

<400> 13
gac atc gag ctg act cag tct cca aaa ttc atg tcc aca tca gta gga 48
Asp Ile Glu Leu Thr Gln Ser Pro Lys Phe Met Ser Thr Ser Val Gly
1 5 10 15

gac agg gtc agc gtc acc tgc aag gcc agt cag aat gtg gat act aat 96
Asp Arg Val Ser Val Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asn Val Asp Thr Asn
20 25 30

gta gcc tgg tat caa cag aaa cca ggg caa tct cct aaa gca ctg att 144
Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Lys Ala Leu Ile
35 40 45

tac tcg gca tcc tac cgg tac agt gga gtc cct gat cgc ttc aca ggc 192
Tyr Ser Ala Ser Tyr Arg Tyr Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly
50 55 60

agt gga tct ggg aca gat ttc act ctc acc atc agc aat gtg cag tct 240
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Asn Val Gln Ser
65 70 75 80

gaa gac ttg gca gag tat ttc tgt cag caa tat aac agc ttt cct tac 288
Glu Asp Leu Ala Glu Tyr Phe Cys Gln Gln Tyr Asn Ser Phe Pro Tyr
85 90 95

acg ttc gga ggg ggg acc aag ctg gaa ata aaa cgg gcg 327
Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Ala
100 105

<210> 14
<211> 109
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 14
Asp Ile Glu Leu Thr Gln Ser Pro Lys Phe Met Ser Thr Ser Val Gly
1 5 10 15

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

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

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

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

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

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

<210> 15
 <211> 357
 <212> DNA
 <213> Mus musculus

<220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(357)

<400> 15
 cag gtg cag ctg aag cag tca gga cct ggc cta gtg cag ccc tca cag 48
 Gln Val Gln Leu Lys Gln Ser Gly Pro Gly Leu Val Gln Pro Ser Gln
 1 5 10 15
 agc ctg tcc atc acc tgc aca gtc tct ggt ttc tca tta act aac tat 96
 Ser Leu Ser Ile Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu Thr Asn Tyr
 20 25 30
 ggt gta cac tgg gtt cgc cag tct cca gga aag ggt ctg gag tgg ctg 144
 Gly Val His Trp Val Arg Gln Ser Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Leu
 35 40 45
 gga gtg ata tgg agt ggt gga aac aca gac tat aat aca cct ttc aca 192
 Gly Val Ile Trp Ser Gly Gly Asn Thr Asp Tyr Asn Thr Pro Phe Thr
 50 55 60
 tcc aga ctg agc atc aac aag gac aat tcc aag agc caa gtt ttc ttt 240
 Ser Arg Leu Ser Ile Asn Lys Asp Asn Ser Lys Ser Gln Val Phe Phe
 65 70 75 80
 aaa atg aac agt ctg caa tct aat gac aca gcc ata tat tac tgt gcc 288
 Lys Met Asn Ser Leu Gln Ser Asn Asp Thr Ala Ile Tyr Tyr Cys Ala
 85 90 95
 aga gcc ctc acc tac tat gat tac gag ttt gct tac tgg ggc caa ggg 336
 Arg Ala Leu Thr Tyr Tyr Asp Tyr Glu Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly
 100 105 110
 act ctg gtc act gtc tct gca 357
 Thr Leu Val Thr Val Ser Ala
 115

<210> 16
 <211> 119
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

<400> 16
 Gln Val Gln Leu Lys Gln Ser Gly Pro Gly Leu Val Gln Pro Ser Gln
 1 5 10 15
 Ser Leu Ser Ile Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu Thr Asn Tyr
 20 25 30
 Gly Val His Trp Val Arg Gln Ser Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Leu
 35 40 45

Gly Val Ile Trp Ser Gly Gly Asn Thr Asp Tyr Asn Thr Pro Phe Thr
50 55 60

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

Lys Met Asn Ser Leu Gln Ser Asn Asp Thr Ala Ile Tyr Tyr Cys Ala
85 90 95

Arg Ala Leu Thr Tyr Tyr Asp Tyr Glu Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ala
115

<210> 17
<211> 321
<212> DNA
<213> Mus musculus

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(321)

<400> 17
gac atc ttg ctg act cag tct cca gtc atc ctg tct gtg agt cca gga 48
Asp Ile Leu Leu Thr Gln Ser Pro Val Ile Leu Ser Val Ser Pro Gly
1 5 10 15
gaa aga gtc agt ttc tcc tgc agg gcc agt cag agt att ggc aca aac 96
Glu Arg Val Ser Phe Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Gly Thr Asn
20 25 30
ata cac tgg tat cag caa aga aca aat ggt tct cca agg ctt ctc ata 144
Ile His Trp Tyr Gln Gln Arg Thr Asn Gly Ser Pro Arg Leu Leu Ile
35 40 45
aag tat gct tct gag tct atc tct ggg atc cct tcc agg ttt agt ggc 192
Lys Tyr Ala Ser Glu Ser Ile Ser Gly Ile Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60
agt gga tca ggg aca gat ttt act ctt agc atc aac agt gtg gag tct 240
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Ser Ile Asn Ser Val Glu Ser
65 70 75 80
gaa gat att gca gat tat tac tgt caa caa aat aat aac tgg cca acc 288
Glu Asp Ile Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Gln Asn Asn Asn Trp Pro Thr
85 90 95
acg ttc ggt gct ggg acc aag ctg gag ctg aaa 321
Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys
100 105

<210> 18

<211> 107
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

<400> 18

Asp Ile Leu Leu Thr Gln Ser Pro Val 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 Asn
 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 Asn Asn Asn Trp Pro Thr
 85 90 95

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

<210> 19
 <211> 363
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(363)

<400> 19

cag gtg cag ctg cag gag tcg ggc cca gga ctg gtg aag cct tca cag 48
 Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Gln
 1 5 10 15

acc ctg tcc ctc acc tgc act gtc tct ggt ggc tcc atc agc agt ggt 96
 Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Ile Ser Ser Gly
 20 25 30

gat tac tac tgg agt tgg atc cgc cag ccc cca ggg aag ggc ctg gag 144
 Asp Tyr Tyr Trp Ser Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu
 35 40 45

tgg att ggg tac atc tat tac agt ggg agc acc gac tac aac ccg tcc 192
 Trp Ile Gly Tyr Ile Tyr Tyr Ser Gly Ser Thr Asp Tyr Asn Pro Ser
 50 55 60

ctc aag agt cga gtc acc atg tcc gta gac acg tcc aag aat cag ttt 240
 Leu Lys Ser Arg Val Thr Met Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe

<400> 21
gaa att gtg atg aca cag tct cca gcc acc ctg tct ttg tct cca ggg 48
Glu Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
1 5 10 15

gaa aga gcc acc ctc tcc tgc agg gcc agt cag agt gtt agc agc tac 96
Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Tyr
20 25 30

tta gcc tgg tac caa cag aaa cct ggc cag gct ccc agg ctc ctc atc 144
Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile
35 40 45

tat gat gca tcc aac agg gcc act ggc atc cca gcc agg ttc agt ggc 192
Tyr Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly
50 55 60

agt ggg tct ggg aca gac ttc act ctc acc atc agc agc cta gag cct 240
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro
65 70 75 80

gaa gat ttt gca gtg tat tac tgt cac cag tat ggt agc aca cct ctc 288
Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys His Gln Tyr Gly Ser Thr Pro Leu
85 90 95

act ttc ggc gga ggg acc aag gcg gag atc aaa 321
Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Ala Glu Ile Lys
100 105

<210> 22
<211> 107
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 22
Glu Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
1 5 10 15

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

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

Tyr Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly
50 55 60

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

Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys His Gln Tyr Gly Ser Thr Pro Leu
85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Ala Glu Ile Lys

100

105

<210> 23
 <211> 390
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(390)

<400> 23
 gag gtc cag ctg gtg cag tct ggg gct gag gtg aag aag cct ggg tcc 48
 Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser
 1 5 10 15
 tcg gtg aag gtc tcc tgc aag gct tct gga ggc acc ttc agc agc tat 96
 Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Gly Thr Phe Ser Ser Tyr
 20 25 30
 gct atc agc tgg gtg cga cag gcc cct gga caa ggg ctt gag tgg atg 144
 Ala Ile Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
 35 40 45
 gga ggg atc atc cct atc ttt ggt aca gca aac tac gca cag aag ttc 192
 Gly Gly Ile Ile Pro Ile Phe Gly Thr Ala Asn Tyr Ala Gln Lys Phe
 50 55 60
 cag ggc aga gtc acg att acc gcg gac aaa tcc acg agc aca gcc tac 240
 Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 atg gag ctg agc agc ctg aga tct gag gac acg gcc gtg tat tac tgt 288
 Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 gcg aga gcg cca tta cga ttt ttg gag tgg tcc acc caa gac cac tac 336
 Ala Arg Ala Pro Leu Arg Phe Leu Glu Trp Ser Thr Gln Asp His Tyr
 100 105 110
 tac tac tac tac atg gac gtc tgg ggc aaa ggg acc acg gtc acc gtc 384
 Tyr Tyr Tyr Tyr Met Asp Val Trp Gly Lys Gly Thr Thr Val Thr Val
 115 120 125
 tca agc 390
 Ser Ser
 130

<210> 24
 <211> 130
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 24

Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser
 1 5 10 15
 Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Gly Thr Phe Ser Ser Tyr

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

<210> 25
 <211> 327
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(327)

<400>	25																				
tct	tct	gag	ctg	act	cag	gac	cct	gct	gtg	tct	gtg	gcc	ttg	gga	cag						48
Ser	Ser	Glu	Leu	Thr	Gln	Asp	Pro	Ala	Val	Ser	Val	Ala	Leu	Gly	Gln						
1				5					10					15							
aca	gtc	agg	atc	aca	tgc	caa	gga	gac	agc	ctc	aga	agc	tat	tat	gca						96
Thr	Val	Arg	Ile	Thr	Cys	Gln	Gly	Asp	Ser	Leu	Arg	Ser	Tyr	Tyr	Ala						
			20					25					30								
agc	tgg	tac	cag	cag	aag	cca	gga	cag	gcc	cct	gta	ctt	gtc	atc	tat						144
Ser	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Pro	Gly	Gln	Ala	Pro	Val	Leu	Val	Ile	Tyr						
		35					40					45									
ggt	aaa	aac	aac	cgg	ccc	tca	ggg	atc	cca	gac	cga	ttc	tct	ggc	tcc						192
Gly	Lys	Asn	Asn	Arg	Pro	Ser	Gly	Ile	Pro	Asp	Arg	Phe	Ser	Gly	Ser						
	50					55				60											
agc	tca	gga	aac	aca	gct	tcc	ttg	acc	atc	act	ggg	gct	cag	gcg	gaa						240
Ser	Ser	Gly	Asn	Thr	Ala	Ser	Leu	Thr	Ile	Thr	Gly	Ala	Gln	Ala	Glu						
65					70					75					80						
gat	gag	gct	gac	tat	tac	tgt	aac	tcc	cgg	gac	aac	agt	gat	aac	cgt						288

Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Asn Ser Arg Asp Asn Ser Asp Asn Arg
 85 90 95

ctg ata ttt ggc ggc ggg acc aag ctg acc gtc ctc agt 327
 Leu Ile Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Ser
 100 105

<210> 26
 <211> 109
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 26

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

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

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

Gly Lys Asn Asn Arg Pro Ser Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser
 50 55 60

Ser Ser Gly Asn Thr Ala Ser Leu Thr Ile Thr Gly Ala Gln Ala Glu
 65 70 75 80

Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Asn Ser Arg Asp Asn Ser Asp Asn Arg
 85 90 95

Leu Ile Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Ser
 100 105

<210> 27
 <211> 378
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(378)

<400> 27

cag gcg cag gtg gtg gag tct ggg gga ggc gtg gtc cag tct ggg agg 48
 Gln Ala Gln Val Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Ser Gly Arg
 1 5 10 15

tcc ctg aga ctc tcc tgt gca gcg tct gga ttc gcc ttc agt agc tac 96
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ala Phe Ser Ser Tyr
 20 25 30

ggc atg cac tgg gtc cgc cag gct cca ggc aag ggg ctg gag tgg gtg 144

Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45

gca gtt ata tgg tat gat gga agt aat aaa tac tat gca gac tcc gtg 192
 Ala Val Ile Trp Tyr Asp Gly Ser Asn Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60

agg ggc cga ttc acc atc tcc aga gac aat tcc gag aac acg ctg tat 240
 Arg Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Glu Asn Thr Leu Tyr
 65 70 75 80

ctg caa atg aac agc ctg aga gcc gag gac acc gct gtg tat tac tgt 288
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95

gcc aga gat cac tat ggt tcg ggg gtg cac cac tat ttc tac tac ggt 336
 Ala Arg Asp His Tyr Gly Ser Gly Val His His Tyr Phe Tyr Tyr Gly
 100 105 110

ctg gac gtc tgg ggc caa ggg acc acg gtc acc gtc tcc tca 378
 Leu Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 115 120 125

<210> 28
 <211> 126
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 28

Gln Ala Gln Val Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Ser Gly Arg
 1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ala Phe Ser Ser Tyr
 20 25 30

Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45

Ala Val Ile Trp Tyr Asp Gly Ser Asn Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60

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

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

Ala Arg Asp His Tyr Gly Ser Gly Val His His Tyr Phe Tyr Tyr Gly
 100 105 110

Leu Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 115 120 125

<210> 29
 <211> 324
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(324)

<400> 29
 gaa att gtg ttg acg cag tct cca ggc acc ctg tct ttg tct cca ggg 48
 Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
 1 5 10 15

gaa aga gcc acc ctc tcc tgc agg gcc agt cag agt gtt agc agc agc 96
 Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Ser
 20 25 30

tac tta gcc tgg tac cag cag aaa cct ggc cag gct ccc agg ctc ctc 144
 Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu
 35 40 45

atc tat ggt gca tcc agc agg gcc act ggc atc cca gac agg ttc agt 192
 Ile Tyr Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser
 50 55 60

ggc agt ggg tct ggg aca gac ttc act ctc acc atc agc aga ctg gag 240
 Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu
 65 70 75 80

cct gaa gat ttt gca gtg tat tac tgt cag cag tat ggt agc tca ccg 288
 Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Gly Ser Ser Pro
 85 90 95

ctc act ttc ggc gga ggg acc aag gtg gag atc aaa 324
 Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105

<210> 30
 <211> 108
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 30
 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

Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105

<210> 31
<211> 363
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(363)

<400> 31
gag gtg cag ctg gtg cag tct ggg gct gag gtg aag aag cct ggg gcc 48
Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15
tca gtg aag gtt tcc tgc aag gtt tct gga tac acc ttc acc gac tac 96
Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Val Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr
20 25 30
tac atg cac tgg gtg caa cag gcc cct gga aaa ggg ctt gag tgg atg 144
Tyr Met His Trp Val Gln Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45
gga ctt gtt gat cct gaa gat ggt gaa aca atc tac gca gag aag ttc 192
Gly Leu Val Asp Pro Glu Asp Gly Glu Thr Ile Tyr Ala Glu Lys Phe
50 55 60
cag ggc aga gtc acc ata acc gcg gac acg tct aca gac aca gcc tac 240
Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Thr Ser Thr Asp Thr Ala Tyr
65 70 75 80
atg gag ctg agc agc ctg aga tct gag gac acg gcc gtg tat tac tgt 288
Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95
gcg aga gat gac tac atg gac gtc tgg ggc aaa ggc acc ctg gtc acc 336
Ala Arg Asp Asp Tyr Met Asp Val Trp Gly Lys Gly Thr Leu Val Thr
100 105 110
gtc tca agc gcc tcc acc aag ggc cca 363
Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro
115 120

<210> 32
<211> 121
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 32

Glu 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 Val Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr
20 25 30

Tyr Met His Trp Val Gln Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45

Gly Leu Val Asp Pro Glu Asp Gly Glu Thr Ile Tyr Ala Glu Lys Phe
50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Thr Ser Thr Asp Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Asp Asp Tyr Met Asp Val Trp Gly Lys Gly Thr Leu Val Thr
100 105 110

Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro
115 120

<210> 33
<211> 330
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(330)

<400> 33
gaa acg aca ctc acg cag tct cca gac acc ctg tct ttg tct cca gga 48
Glu Thr Thr Leu Thr Gln Ser Pro Asp Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
1 5 10 15
gaa gga gcc acc ctc tcc tgt agg gcc agt cag agt gtt agc ggc agt 96
Glu Gly Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Gly Ser
20 25 30
gcg ttg gcc tgg tac cag cag aaa cct ggc cag gct ccc aga ctc ctc 144
Ala Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu
35 40 45
atc tat gat gca tcc agt agg gcc act ggc gtc cca gac agg ttc agt 192
Ile Tyr Asp Ala Ser Ser Arg Ala Thr Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser
50 55 60
ggc agt ggg tct ggg gca gac ttc agt ctc acc atc agc aga ctg gag 240
Gly Ser Gly Ser Gly Ala Asp Phe Ser Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu
65 70 75 80

tat atg cac tgg gtg cga cag gcc cct gga caa ggg ctt gag tgg atg 144
 Tyr Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
 35 40 45

gga agg atc atc cct atc ctt ggt ata gca aac tac gca cag aag ttc 192
 Gly Arg Ile Ile Pro Ile Leu Gly Ile Ala Asn Tyr Ala Gln Lys Phe
 50 55 60

cag ggc aga gtc acg att acc gcg gac aaa tcc acg agc aca gcc tac 240
 Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80

atg gag ctg agc agc ctg aga tct gag gac acg gcc gtg tac tac tgt 288
 Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95

gcg aga gga gga gat ctg ggc ggt atg gac gtc tgg ggc caa ggg a 334
 Ala Arg Gly Gly Asp Leu Gly Gly Met Asp Val Trp Gly Gln Gly
 100 105 110

<210> 36
 <211> 111
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 36

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

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Ser 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 Arg Ile Ile Pro Ile Leu Gly Ile Ala Asn Tyr Ala Gln Lys Phe
 50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95

Ala Arg Gly Gly Asp Leu Gly Gly Met Asp Val Trp Gly Gln Gly
 100 105 110

<210> 37
 <211> 342
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(342)

<400> 37

gaa att gtg ctg act cag tct cca ctc tcc ctg ccc gtc acc cct gga 48
 Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Pro Gly
 1 5 10 15

gag ccg gcc tcc atc tcc tgc agg tct agt cag agc ctc cgg cat agt 96
 Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Arg His Ser
 20 25 30

aat gga tac aac tat ttg gat tgg tac ctg cag aag cca ggg cag tct 144
 Asn Gly Tyr Asn Tyr Leu Asp Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
 35 40 45

cca cag ctc ctg atc tat ttg gct tct aat cgg gcc tcc ggg gtc cct 192
 Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Leu Ala Ser Asn Arg Ala Ser Gly Val Pro
 50 55 60

gac agg ttc agt ggc agt gga tca ggc aca gat ttt aca ctg aaa atc 240
 Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
 65 70 75 80

agc aga gtg gag gct gag gat gtt ggg gtt tat tac tgc atg caa gct 288
 Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Met Gln Ala
 85 90 95

cta caa att cct ccg act ttc ggc cct ggg acc aaa gtg gat atc aaa 336
 Leu Gln Ile Pro Pro Thr Phe Gly Pro Gly Thr Lys Val Asp Ile Lys
 100 105 110

cga act 342
 Arg Thr

<210> 38

<211> 114

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 38

Glu Ile Val Leu 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 Arg His Ser
 20 25 30

Asn Gly Tyr Asn Tyr Leu Asp Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
 35 40 45

Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Leu Ala Ser Asn Arg Ala Ser Gly Val Pro
 50 55 60

Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
 65 70 75 80

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Met Gln Ala
85 90 95

Leu Gln Ile Pro Pro Thr Phe Gly Pro Gly Thr Lys Val Asp Ile Lys
100 105 110

Arg Thr

<210> 39
<211> 372
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(372)

<400> 39
cag gtg cag ctg gtg gag ttt ggc cca gga ctg gtg aag cct tcg gag 48
Gln Val Gln Leu Val Glu Phe Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu
1 5 10 15
acc ctg tcc ctc acc tgc act gtc tct ggt ggc tcc atc agt agt tac 96
Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Ile Ser Ser Tyr
20 25 30
tac tgg agc tgg atc cgg cag ccc cca ggg aag gga ctg gag tgg att 144
Tyr Trp Ser Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45
ggg tat atc tat tac agt ggg agc acc aac tac aac ccc tcc ctc aag 192
Gly Tyr Ile Tyr Tyr Ser Gly Ser Thr Asn Tyr Asn Pro Ser Leu Lys
50 55 60
agt cga gtc gcc ata tca gta gac acg tcc aag aac cag ttc tcc ctg 240
Ser Arg Val Ala Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu
65 70 75 80
aag ctg agc tct gtg acc gcc gcg gac acg gcc gtg tat tac tgt gcg 288
Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
85 90 95
aga gag tat tac tat gat agt agt ggt tat tac ttt tat gct ttt gat 336
Arg Glu Tyr Tyr Tyr Asp Ser Ser Gly Tyr Tyr Phe Tyr Ala Phe Asp
100 105 110
atc tgg ggc caa ggg acc acg gtc acc gtc tca agc 372
Ile Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 40
<211> 124
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 40

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

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

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

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

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

Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
85 90 95

Arg Glu Tyr Tyr Tyr Asp Ser Ser Gly Tyr Tyr Phe Tyr Ala Phe Asp
100 105 110

Ile Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 41
<211> 333
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(333)

<400> 41
ctg cct gtg ctg act cag ccc ccc tca gcg tct ggg acc ccc ggg cag 48
Leu Pro Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Ala Ser Gly Thr Pro Gly Gln
1 5 10 15
agg gtc tcc atc tct tgt tct gga agc agc tcc aac atc gga agt aat 96
Arg Val Ser Ile Ser Cys Ser Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly Ser Asn
20 25 30
tat gta tac tgg tac cag cag ctc cca gga acg gcc ccc aaa ctc ctc 144
Tyr Val Tyr Trp Tyr Gln Gln Leu Pro Gly Thr Ala Pro Lys Leu Leu
35 40 45
atc ttt agg aat aat cag cgg ccc tca ggg gtc cct gac cga ttc tct 192
Ile Phe Arg Asn Asn Gln Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser
50 55 60
ggc tcc aag tct ggc act tca gcc tcc ctg gcc atc agt ggg ctc cgg 240
Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Ser Leu Ala Ile Ser Gly Leu Arg
65 70 75 80

tac tgg agt tgg gtc cgg cag ccc cca ggg aag gga ctg gag tgg att 144
Tyr Trp Ser Trp Val Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45

ggg tac atc tat tac agt ggg agc acc aac tac aac ccc tcc ctc aag 192
Gly Tyr Ile Tyr Tyr Ser Gly Ser Thr Asn Tyr Asn Pro Ser Leu Lys
50 55 60

agt cga gtc acc ata tca gta gac acg tcc aag aac cag ttc tcc ctg 240
Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu
65 70 75 80

aac ctg agc tct gtg acc gct gcg gac acg gcc gtg tat tat tgt gcg 288
Asn Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
85 90 95

aga att ccc aac tac tat gat aga agt ggt tat tat ccc ggt tac tgg 336
Arg Ile Pro Asn Tyr Tyr Asp Arg Ser Gly Tyr Tyr Pro Gly Tyr Trp
100 105 110

tac ttc gat ctc tgg ggc cgt ggc acc ctg gtc acc gtc tca agc 381
Tyr Phe Asp Leu Trp Gly Arg Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120 125

<210> 44

<211> 127

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 44

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

Ile Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Ile Ser Ser His
20 25 30

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

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

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

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

Arg Ile Pro Asn Tyr Tyr Asp Arg Ser Gly Tyr Tyr Pro Gly Tyr Trp
100 105 110

Tyr Phe Asp Leu Trp Gly Arg Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120 125

<210> 45
 <211> 345
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(345)

<400> 45
 cag gct gtg ctg act cag ccg tct tcc ctc tct gca cct cct gga gca 48
 Gln Ala Val Leu Thr Gln Pro Ser Ser Leu Ser Ala Pro Pro Gly Ala
 1 5 10 15
 tca gcc agt ctc acc tgc acc ttg cgc agt ggc ttc aat gtt gat tcc 96
 Ser Ala Ser Leu Thr Cys Thr Leu Arg Ser Gly Phe Asn Val Asp Ser
 20 25 30
 tac agg ata tcc tgg tac cag cag aag cca ggg agt cct ccc cag tat 144
 Tyr Arg Ile Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Ser Pro Pro Gln Tyr
 35 40 45
 ctc ctg agg tac aaa tca gac tca gat aag cag cag ggc tct gga gtc 192
 Leu Leu Arg Tyr Lys Ser Asp Ser Asp Lys Gln Gln Gly Ser Gly Val
 50 55 60
 ccc agc cgc ttc tct gga tcc aaa gat gct tcg gcc aat gca ggg att 240
 Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Lys Asp Ala Ser Ala Asn Ala Gly Ile
 65 70 75 80
 tta ctc atc tct ggg ctc cag tct gag gat gag gct gac tat tac tgt 288
 Leu Leu Ile Ser Gly Leu Gln Ser Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 atg att tgg cac agc agc gct tgg gtg ttc ggc gga ggg acc aag ctg 336
 Met Ile Trp His Ser Ser Ala Trp Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu
 100 105 110
 acc gtc cta 345
 Thr Val Leu
 115

<210> 46
 <211> 115
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 46
 Gln Ala Val Leu Thr Gln Pro Ser Ser Leu Ser Ala Pro Pro Gly Ala
 1 5 10 15
 Ser Ala Ser Leu Thr Cys Thr Leu Arg Ser Gly Phe Asn Val Asp Ser
 20 25 30
 Tyr Arg Ile Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Ser Pro Pro Gln Tyr
 35 40 45

Leu Leu Arg Tyr Lys Ser Asp Ser Asp Lys Gln Gln Gly Ser Gly Val
50 55 60

Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Lys Asp Ala Ser Ala Asn Ala Gly Ile
65 70 75 80

Leu Leu Ile Ser Gly Leu Gln Ser Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys
85 90 95

Met Ile Trp His Ser Ser Ala Trp Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu
100 105 110

Thr Val Leu
115

<210> 47
<211> 372
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(372)

<400> 47
gag gtc cag ctg gtg cag tct ggg gga ggc ttg gtc aag cct gga ggg 48
Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly
1 5 10 15
tcc ctg aga ctc tcc tgt gca gcc tct gga ttc acc ttc agt agc tat 96
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
20 25 30
gct atg cac tgg gtc cgc cag gct cca ggc aag ggg ctg gag tgg gtg 144
Ala Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45
gca gtt ata tca tat gat gga agt aat aaa tac tac gca gac tcc gtg 192
Ala Val Ile Ser Tyr Asp Gly Ser Asn Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60
aag ggc cga ttc acc atc tcc aga gac aat tcc aag aac acg ctg tat 240
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80
ctg caa atg aac agc ctg aga gct gag gac acg gct gtg tat tac tgt 288
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95
gcg agg ttc agt ggc tgg ccc aac aac tac tac tac tac ggt atg gac 336
Ala Arg Phe Ser Gly Trp Pro Asn Asn Tyr Tyr Tyr Tyr Gly Met Asp
100 105 110
gtc tgg ggc caa ggg acc acg gtc acc gtc tca agc 372
Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser

115

120

<210> 48
 <211> 124
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 48

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
 20 25 30

Ala Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45

Ala Val Ile Ser Tyr Asp Gly Ser Asn Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
 65 70 75 80

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

Ala Arg Phe Ser Gly Trp Pro Asn Asn Tyr Tyr Tyr Tyr Gly Met Asp
 100 105 110

Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 49
 <211> 339
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(339)

<400> 49

gat gtt gtg atg act cag tct cca ctc tcc ctg ccc gtc acc cct gga 48
 Asp Val Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Pro Gly
 1 5 10 15

gag ccg gcc tcc atc tcc tgc agg tct agt cag agc ctc ctg cat agt 96
 Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Leu His Ser
 20 25 30

aat gga ttc aac tat gtg gat tgg tac ctg cag aag cca ggg cag tct 144
 Asn Gly Phe Asn Tyr Val Asp Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser

35	40	45	
cca cac ctc ttg atc tat ttc ggt tct tat cgg gcc tcc ggg gtc cct			192
Pro His Leu Leu Ile Tyr Phe Gly Ser Tyr Arg Ala Ser Gly Val Pro			
50	55	60	
gac agg ttc agt ggc agt gga tca ggc aca gat ttt aca ctg aaa atc			240
Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile			
65	70	75	80
agc aga gtg gag gct gag gat gtt ggg gtt tat tac tgc atg caa gct			288
Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Met Gln Ala			
85	90	95	
ctg caa act cct ccc tgg acg ttc ggc caa ggg acc aag gtg gaa atc			336
Leu Gln Thr Pro Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile			
100	105	110	
aga			339
Arg			

<210> 50
 <211> 113
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 50

Asp Val 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

Asn Gly Phe Asn Tyr Val Asp Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
 35 40 45

Pro His Leu Leu Ile Tyr Phe Gly Ser Tyr Arg Ala Ser Gly Val Pro
 50 55 60

Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
 65 70 75 80

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Met Gln Ala
 85 90 95

Leu Gln Thr Pro Pro Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile
 100 105 110

Arg

<210> 51

<211> 369
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(369)

<400> 51
 cag gta cag ctg cag cag tca ggt cca gga ctg gtg aag ccc tcg cag 48
 Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Gln
 1 5 10 15
 acc ctc tca ctc acc tgt gcc atc tcc ggg gac aat gtc tct agc aac 96
 Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ala Ile Ser Gly Asp Asn Val Ser Ser Asn
 20 25 30
 agt gct act tgg aat tgg atc agg cag tcc cca tcg aga ggc ctt gag 144
 Ser Ala Thr Trp Asn Trp Ile Arg Gln Ser Pro Ser Arg Gly Leu Glu
 35 40 45
 tgg ctg gga agg aca tac tac agg tcc aag tgg tat aat gag tat gca 192
 Trp Leu Gly Arg Thr Tyr Tyr Arg Ser Lys Trp Tyr Asn Glu Tyr Ala
 50 55 60
 gta tct gtg aaa agt cga ata acc atc aac gga gac aca tcc aag aac 240
 Val Ser Val Lys Ser Arg Ile Thr Ile Asn Gly Asp Thr Ser Lys Asn
 65 70 75 80
 cag ttc tcc ctg cag ttg aac tct gtg act ccc gac gac acg gct gta 288
 Gln Phe Ser Leu Gln Leu Asn Ser Val Thr Pro Asp Asp Thr Ala Val
 85 90 95
 tat tat tgt gca aga gga tat aga gag agc cac tgg acc tat gac tac 336
 Tyr Tyr Cys Ala Arg Gly Tyr Arg Glu Ser His Trp Thr Tyr Asp Tyr
 100 105 110
 tgg ggc ctg gga acc ctg gtc acc gtc tca agc 369
 Trp Gly Leu Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 52
 <211> 123
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 52
 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 Asn Val Ser Ser Asn
 20 25 30
 Ser Ala Thr 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 Glu Tyr Ala

50	55	60	
Val Ser Val Lys Ser Arg Ile Thr Ile Asn Gly Asp Thr Ser Lys Asn 65	70	75	80
Gln Phe Ser Leu Gln Leu Asn Ser Val Thr Pro Asp Asp Thr Ala Val 85	90		95
Tyr Tyr Cys Ala Arg Gly Tyr Arg Glu Ser His Trp Thr Tyr Asp Tyr 100	105		110
Trp Gly Leu Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser 115	120		
<210>	53		
<211>	327		
<212>	DNA		
<213>	Homo sapiens		
<220>			
<221>	CDS		
<222>	(1)..(327)		
<400>	53		
gaa acg aca ctc acg cag tct cca ggc acc ctg tca ttg tct cca ggg			48
Glu Thr Thr Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly			
1	5	10	15
gaa aga ggc acc ctc tcc tgc agg tcc agt cag agt gtt acc aga aac			96
Glu Arg Gly Thr Leu Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Val Thr Arg Asn			
	20	25	30
tac ttg gcc tgg tac cag cag aaa gct ggc cag gct ccc agg ctc ctc			144
Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Ala Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu			
	35	40	45
atc tat ggt gca tcc agc agg gcc act ggc atc cca ctc agg ttc agt			192
Ile Tyr Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr Gly Ile Pro Leu Arg Phe Ser			
	50	55	60
ggc agt ggg tct ggg aca gac ttc act ctc acc atc agc gga ctg gag			240
Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Gly Leu Glu			
65	70	75	80
cct gaa gat ttt gca gtg tat ttc tgt cag cag tat gag atc tca ccg			288
Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Phe Cys Gln Gln Tyr Glu Ile Ser Pro			
	85	90	95
ccc act ttc ggc gga ggg acc aag gtc gag atc aaa cga			327
Pro Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg			
	100	105	
<210>	54		
<211>	109		
<212>	PRT		
<213>	Homo sapiens		

<400> 54

Glu Thr Thr Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
 1 5 10 15

Glu Arg Gly Thr Leu Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Val Thr Arg Asn
 20 25 30

Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Ala Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu
 35 40 45

Ile Tyr Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr Gly Ile Pro Leu Arg Phe Ser
 50 55 60

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

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

Pro Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
 100 105

<210> 55

<211> 360

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(360)

<400> 55

cag gtg cag ctg cag gag tcc ggc cca gga ctg gtg aag cct tcg gag 48
 Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu
 1 5 10 15

acc ctg tcc ctc acc tgc act gtc tct ggt ggc tcc atc agc agc agt 96
 Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Ile Ser Ser Ser
 20 25 30

tat tac tac tgg ggc tgg atc cga cag ccc cca ggg aag ggg ctg gag 144
 Tyr Tyr Tyr Trp Gly Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu
 35 40 45

tgg att ggg agt atc tat tat act ggg agc agc tac tac aac ccg tca 192
 Trp Ile Gly Ser Ile Tyr Tyr Thr Gly Ser Ser Tyr Tyr Asn Pro Ser
 50 55 60

ctc aag agt cga gtc acc ata tcc tta gac acg tcc aag aat gag ttc 240
 Leu Lys Ser Arg Val Thr Ile Ser Leu Asp Thr Ser Lys Asn Glu Phe
 65 70 75 80

tcc ctc aag ctg agc tct gtg acc gcc gca gac acg gcc gtg tat tac 288

Ser Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr
85 90 95

tgt gcg aga gcg ggt ggc agt tcg acc tgg ttc gac ccc tgg ggc cag 336
Cys Ala Arg Ala Gly Gly Ser Ser Thr Trp Phe Asp Pro Trp Gly Gln
100 105 110

ggc acc ctg gtc acc gtc tca agc 360
Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 56
<211> 120
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 56

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

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

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

Trp Ile Gly Ser Ile Tyr Tyr Thr Gly Ser Ser Tyr Tyr Asn Pro Ser
50 55 60

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

Ser Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr
85 90 95

Cys Ala Arg Ala Gly Gly Ser Ser Thr Trp Phe Asp Pro Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 57
<211> 339
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(339)

<400> 57
gat gtt gtg atg act cag tct cca ctc tcc ctg ccc gtc acc cct gga 48

Asp Val Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Pro Gly
 1 5 10 15
 gag ccg gcc tcc atc tcc tgc agg tct agt cgg agc ctc ctg cat agt 96
 Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Arg Ser Leu Leu His Ser
 20 25 30
 aat gga tac aac tat ttg gat tgg tac ctg cag aag cca ggg cag tct 144
 Asn Gly Tyr Asn Tyr Leu Asp Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
 35 40 45
 cca cag ctc ctg atc tat ttg ggt tct aat cgg gcc tcc ggg gtc cct 192
 Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Leu Gly Ser Asn Arg Ala Ser Gly Val Pro
 50 55 60
 gac agg ttc agt ggc agt gga tca ggc aca gat ttt aca ctg aaa atc 240
 Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
 65 70 75 80
 agc aga gtg gag gct gag gat gtt gga gtt tat tac tgc atg caa gct 288
 Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Met Gln Ala
 85 90 95
 cta cga act cct ctg act ttc ggc cct ggg acc aaa gtg gat atc aaa 336
 Leu Arg Thr Pro Leu Thr Phe Gly Pro Gly Thr Lys Val Asp Ile Lys
 100 105 110
 cga 339
 Arg

<210> 58
 <211> 113
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 58

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

Leu Arg Thr Pro Leu Thr Phe Gly Pro Gly Thr Lys Val Asp Ile Lys
 100 105 110

Arg

<210> 59
 <211> 351
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(351)

<400> 59
 gag gtc cag ctg gtg cag tct ggg gga ggc ttg gtc cag cct ggg ggg 48
 Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 tcc ctg aga ctc tcc tgt gca gcc tct gga ttc acc gtc agt agc aac 96
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Val Ser Ser Asn
 20 25 30
 tac gtg agc tgg gtc cgc cag gct cca ggg aag ggg ctg gag tgg gtc 144
 Tyr Val Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 tca gtt att tat agc ggt ggt agc aca tac tac gca gac tcc gtg aag 192
 Ser Val Ile Tyr Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
 50 55 60
 ggc aga ttc acc atc tcc aga gac aat tcc aag aac acg ctg tat ctt 240
 Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu
 65 70 75 80
 caa atg aac agc ctg aga gcc gag gac acg gct gtg tat tac tgt gcg 288
 Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
 85 90 95
 agg ggc cag tgg ctg ggg ggg ttt gac tac tgg ggc cag gga acc ctg 336
 Arg Gly Gln Trp Leu Gly Gly Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu
 100 105 110
 gtc acc gtc tca agc 351
 Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 60
 <211> 117
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 60

Glu Val Gln Leu Val Gln 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 Val Ser Ser Asn
20 25 30

Tyr Val Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ser Val Ile Tyr Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
50 55 60

Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu
65 70 75 80

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

Arg Gly Gln Trp Leu Gly Gly Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu
100 105 110

Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 61
<211> 327
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(327)

<400> 61
gaa acg aca ctc acg cag tct cca ggc acc ctg tct ttg tct cca ggg 48
Glu Thr Thr Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
1 5 10 15

gaa aga gcc acc ctc tcc tgc agg gcc agt cag agt gtt agc agc agc 96
Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Ser
20 25 30

aac tta gcc tgg tac cag cag aaa cct ggc cag gct ccc agg ctc ctc 144
Asn Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu
35 40 45

atc tat ggt gca tcc agc agg gcc act ggc atc cca gac agg ttc agt 192
Ile Tyr Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser
50 55 60

ggc agt ggg tct ggg aca gac ttc act ctc acc atc agc aga ctg gag 240
Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu
65 70 75 80

cct gaa gat ttt gca gtg tat tac tgt cag cag tat ggt agc tca ctt 288
Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Gly Ser Ser Leu
85 90 95

tgg acg ttc ggc caa ggg acc aag gtg gaa atc aaa cga
 Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
 100 105

327

<210> 62
 <211> 109
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 62

Glu Thr Thr 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

Asn 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 Leu
 85 90 95

Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
 100 105

<210> 63
 <211> 360
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(360)

<400> 63

gag gtc cag ctg gta cag tct gga gct gag gtg aag aag cct ggg gcc 48
 Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15

tca gtg aag gtc tcc tgc aag gct tct ggt tac acc ttt acc agc tat 96
 Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr
 20 25 30

ggt atc agc tgg gtg cga cag gcc cct gga caa ggg ctt gag tgg atg 144
 Gly Ile Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
 35 40 45

gga tgg atc agc gct tac aat ggt aac aca aac tat gca cag aag ctc 192
 Gly Trp Ile Ser Ala Tyr Asn Gly Asn Thr Asn Tyr Ala Gln Lys Leu
 50 55 60

cag ggc aga gtc acc atg acc aca gac aca tcc acg agc aca gcc tac 240
 Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Thr Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80

atg gag ctg agg agc ctg aga tct gac gac acg gcc gtg tat tac tgt 288
 Met Glu Leu Arg Ser Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95

gcg aga gga tac ggg agc tac caa aaa cgt ttt gac tac tgg ggc cag 336
 Ala Arg Gly Tyr Gly Ser Tyr Gln Lys Arg Phe Asp Tyr Trp Gly Gln
 100 105 110

ggc acc ctg gtc acc gtc tca agc 360
 Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 64

<211> 120

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 64

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

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

Gly Ile Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
 35 40 45

Gly Trp Ile Ser Ala Tyr Asn Gly Asn Thr Asn Tyr Ala Gln Lys Leu
 50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Thr Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80

Met Glu Leu Arg Ser Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95

Ala Arg Gly Tyr Gly Ser Tyr Gln Lys Arg Phe Asp Tyr Trp Gly Gln
 100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 65

<211> 384

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(384)

<400> 65

gat att gtg atg acc cac act cca ctc tct ctg tcc gtc acc cct gga 48
 Asp Ile Val Met Thr His Thr Pro Leu Ser Leu Ser Val Thr Pro Gly
 1 5 10 15

cag ccg gcc tcc atc tcc tgc aag tct agt cag agc ctc ctg cat agt 96
 Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu His Ser
 20 25 30

gat gga aag acc tat ttg tat tgg tac ctg cag aag cca ggc cag cct 144
 Asp Gly Lys Thr Tyr Leu Tyr Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Pro
 35 40 45

cca cag ctc ctg atc tat gaa gtt tcc aac cgg ttc tct gga gtg cca 192
 Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Glu Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro
 50 55 60

gag agg ttc agt ggc agc ggg tca ggg aca gct ttc aca ctg aaa atc 240
 Glu Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ala Phe Thr Leu Lys Ile
 65 70 75 80

agc agg gtg gag gct gag gat gtt gga gtt tat tac tgc atg caa cgt 288
 Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Met Gln Arg
 85 90 95

ata gag ttt ccg ccc cct cac ttt cgg cgg agg gac caa ggt gga gat 336
 Ile Glu Phe Pro Pro Pro His Phe Arg Arg Arg Asp Gln Gly Gly Asp
 100 105 110

caa acg aac tgt ggc tgc acc atc tgt ctt cat ctt ccc gcc atc tga 384
 Gln Thr Asn Cys Gly Cys Thr Ile Cys Leu His Leu Pro Ala Ile
 115 120 125

<210> 66

<211> 127

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 66

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

Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu His Ser
 20 25 30

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

Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Glu Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro
 50 55 60

Glu Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ala Phe Thr Leu Lys Ile
65 70 75 80

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Met Gln Arg
85 90 95

Ile Glu Phe Pro Pro Pro His Phe Arg Arg Arg Asp Gln Gly Gly Asp
100 105 110

Gln Thr Asn Cys Gly Cys Thr Ile Cys Leu His Leu Pro Ala Ile
115 120 125

<210> 67
<211> 360
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(360)

<400> 67
gag gtc cag ctg gtg cag tct ggg gct gag gtg aag aag cct ggg gcc 48
Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15
tca gtg aag gtc ttc tgc aag gct tct gga tac acc ttc acc ggc tac 96
Ser Val Lys Val Phe Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Gly Tyr
20 25 30
tat atg cac tgg gtg cga cag gcc cct gga caa ggg ctt gag tgg atg 144
Tyr Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45
gga tgg atc aac cct aac agt ggt ggc aca aac tat gca cag aag ttt 192
Gly Trp Ile Asn Pro Asn Ser Gly Gly Thr Asn Tyr Ala Gln Lys Phe
50 55 60
cag ggc agg gtc acc atg acc agg gac acg tcc atc agc aca gcc tac 240
Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Ile Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80
atg gag ctg agc agg ctg aga tct gac gac acg gcc gtg tat tac tgt 288
Met Glu Leu Ser Arg Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95
gcg aga gct cct tgg agt ggt cgc aga cgc ttt gac tac tgg ggc cag 336
Ala Arg Ala Pro Trp Ser Gly Arg Arg Arg Phe Asp Tyr Trp Gly Gln
100 105 110
gga acc ctg gtc acc gtc tca agc 360
Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 68
<211> 120

<212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 68

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

Ser Val Lys Val Phe 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 Ala Pro Trp Ser Gly Arg Arg Arg Phe Asp Tyr Trp Gly Gln
 100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 69
 <211> 12
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(12)

<400> 69
 cag gcg tgg tga
 Gln Ala Trp
 1

12

<210> 70
 <211> 360
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(360)

<400> 70
gag gtc cag ctg gtg cag tct gag gct gag gtg aag aag cct ggg gcc 48
Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Glu Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15

tca gtg aag gtt tcc tgc aag gct tct gga tac acc ttc act agc tat 96
Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr
20 25 30

gct atg cat tgg gtg cgc cag gcc ccc gga caa agg ctt gag tgg atg 144
Ala Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Arg Leu Glu Trp Met
35 40 45

gga tgg atc aac gct ggc aat ggt aac aca aaa tat tca cag aag ttc 192
Gly Trp Ile Asn Ala Gly Asn Gly Asn Thr Lys Tyr Ser Gln Lys Phe
50 55 60

cag ggc aga gtc acc att acc agg gac acg tcc atc agc aca gcc tac 240
Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Arg Asp Thr Ser Ile Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

atg gag ctg agc agg ctg aga tct gac gac acg gcc gtg tat tac tgt 288
Met Glu Leu Ser Arg Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

gcg aga gga tac ggg agc tac caa aaa cgt ttt gac tac tgg ggc cag 336
Ala Arg Gly Tyr Gly Ser Tyr Gln Lys Arg Phe Asp Tyr Trp Gly Gln
100 105 110

ggc acc ctg gtc acc gtc tca agc 360
Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 71
<211> 120
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 71
Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Glu Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15

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

Ala Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Arg Leu Glu Trp Met
35 40 45

Gly Trp Ile Asn Ala Gly Asn Gly Asn Thr Lys Tyr Ser Gln Lys Phe
50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Ile 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 Gly Tyr Gly Ser Tyr Gln Lys Arg Phe Asp Tyr Trp Gly Gln
 100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 72
 <211> 33
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(33)

<400> 72
 cag gtc caa ctg cag gag ctc gag atc aaa cgt
 Gln Val Gln Leu Gln Glu Leu Glu Ile Lys Arg
 1 5 10

33

<210> 73
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 73

Gln Val Gln Leu Gln Glu Leu Glu Ile Lys Arg
 1 5 10

<210> 74
 <211> 360
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(360)

<400> 74
 gag gtc cag ctg gta cag tct gga gct gag gtg aag aag cct ggg gcc
 Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15

48

tca gtg aag gtc tcc tgc aag gct tct ggt tac acc ttt acc agc tat
 Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr
 20 25 30

96

ggt atc agc tgg gtg cga cag gcc cct gga caa ggg ctt gag tgg atg
 Gly Ile Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
 35 40 45

144

gga tgg atc agc gct tac aat ggt aac aca aac tat gca cag aag ctc
 Gly Trp Ile Ser Ala Tyr Asn Gly Asn Thr Asn Tyr Ala Gln Lys Leu
 50 55 60

192

cag ggc aga gtc acc atg acc aca gac aca tcc acg agc aca gcc tac 240
 Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Thr Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80

atg gag ctg agg agc ctg aga tct gac gac acg gcc gtg tat tac tgt 288
 Met Glu Leu Arg Ser Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95

gcg aga gga tac ggg agc tac caa aaa cgt ttt gac tac tgg ggc cag 336
 Ala Arg Gly Tyr Gly Ser Tyr Gln Lys Arg Phe Asp Tyr Trp Gly Gln
 100 105 110

ggc acc ctg gtc acc gtc tca agc 360
 Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 75

<211> 120

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 75

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

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

Gly Ile Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
 35 40 45

Gly Trp Ile Ser Ala Tyr Asn Gly Asn Thr Asn Tyr Ala Gln Lys Leu
 50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Thr Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80

Met Glu Leu Arg Ser Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95

Ala Arg Gly Tyr Gly Ser Tyr Gln Lys Arg Phe Asp Tyr Trp Gly Gln
 100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 76

<211> 33

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(33)

<400> 76
 cag gtc caa ctg cag gag ctc gag atc aaa cgt 33
 Gln Val Gln Leu Gln Glu Leu Glu Ile Lys Arg
 1 5 10

<210> 77
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 77
 Gln Val Gln Leu Gln Glu Leu Glu Ile Lys Arg
 1 5 10

<210> 78
 <211> 351
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(351)

<400> 78
 cag ctg cag ctg cag gag tcg ggg gga ggc ttg gtc cag cct ggg ggg 48
 Gln Leu Gln Leu Gln Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15

tcc ctg aaa ctc tcc tgt gca gcg tct gga ttc acc ttc agt agc tat 96
 Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
 20 25 30

ggc atg cac tgg gtc cgc cag gct cca ggc aag ggg ctg gag tgg gtg 144
 Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45

gca gtt ata tgg tat gat gga agt aat aaa tac tat gca gac tcc gtg 192
 Ala Val Ile Trp Tyr Asp Gly Ser Asn Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60

aag ggc cga ttc acc atc tcc aga gac aat tcc agg aac acg ctg tat 240
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Arg Asn Thr Leu Tyr
 65 70 75 80

ctg caa atg aac agc ctg aga gcc gag gac acg gct gtg tat tac tgt 288
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95

gcg act tat cct ttt gga gtg gtt cac aac tgg ggc cag ggc acc ctg 336
 Ala Thr Tyr Pro Phe Gly Val Val His Asn Trp Gly Gln Gly Thr Leu
 100 105 110

gtc acc gtc tca agc 351
 Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 79
 <211> 117
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 79

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

Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
 20 25 30

Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45

Ala Val Ile Trp Tyr Asp Gly Ser Asn Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Arg Asn Thr Leu Tyr
 65 70 75 80

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

Ala Thr Tyr Pro Phe Gly Val Val His Asn Trp Gly Gln Gly Thr Leu
 100 105 110

Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 80
 <211> 339
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(339)

<400> 80

gaa att gtg ctg act cag tct cca ctc tcc ctg ccc gtc acc cct gga 48
 Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Pro Gly
 1 5 10 15

gag ccg gcc tcc atc tcc tgc agg tct agt cag agc ctc ctg cat agt 96
 Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Leu His Ser
 20 25 30

aat gga ttc aac tat ttg gat tgg tac ctg cag aag cca ggg cag tct 144
 Asn Gly Phe Asn Tyr Leu Asp Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
 35 40 45

cca cac ctc ttg atc tat ttc ggt tct tat cgg gcc tcc ggg gtc cct 192
 Pro His Leu Leu Ile Tyr Phe Gly Ser Tyr Arg Ala Ser Gly Val Pro
 50 55 60

gac agg ttc agt ggc agt gga tca ggc aca gat ttt aca ctg aaa atc 240
 Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
 65 70 75 80

agc aga gtg gag gct gag gat gtt ggg att tat tac tgc atg caa aat 288
 Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Ile Tyr Tyr Cys Met Gln Asn
 85 90 95

ctt caa act ccg tgg acg ttc ggc caa ggg acc aag gtg gat atc aaa 336
 Leu Gln Thr Pro Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Asp Ile Lys
 100 105 110

cga 339
 Arg

<210> 81
 <211> 113
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 81

Glu Ile Val Leu 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

Asn Gly Phe Asn Tyr Leu Asp Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
 35 40 45

Pro His Leu Leu Ile Tyr Phe Gly Ser Tyr Arg Ala Ser Gly Val Pro
 50 55 60

Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
 65 70 75 80

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Ile Tyr Tyr Cys Met Gln Asn
 85 90 95

Leu Gln Thr Pro Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Asp Ile Lys
 100 105 110

Arg

- 45 -
NY01 1314242 v1

- 1 -
NY01 1314242 v1

REIVINDICAÇÕES

1. Proteína de ligação a antígeno, caracterizada pelo fato de compreender um complexo de dois primeiros polipeptídeos e dois segundos polipeptídeos,

5 cada primeiro polipeptídeo tendo um primeiro sítio de ligação a antígeno localizado no término N de um domínio constante de cadeia leve de imunoglobulina (domínio C_L), referido domínio C_L capaz de associação estável com um primeiro domínio constante de cadeia pesada de imunoglobulina (domínio C_{H1}),

10 cada segundo polipeptídeo tendo um segundo sítio de ligação a antígeno localizado no término N de um domínio C_{H1}, referido domínio C_{H1} seguido por um ou mais domínios constantes de cadeia pesada capazes de uma auto-associação estável;

15 em que pelo menos um referido primeiro sítio de ligação a antígeno e referido segundo sítio de ligação a antígeno é um domínio variável único (sVD).

2. Proteína de ligação a antígeno de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que tanto o referido primeiro como o segundo sítios de ligação a antígeno são domínios variáveis únicos (sVDs).

20 3. Proteína de ligação a antígeno de acordo com a reivindicação 1, caracterizada pelo fato de que um dentre referidos primeiro e segundo sítios de ligação a antígeno é um domínio variável único (sVD) e o outro dos referidos primeiro e segundo sítios de ligação a antígeno é uma cadeia única Fv (scFv).

25 4. Proteína de ligação a antígeno, caracterizada pelo fato de compreender um complexo de dois primeiros polipeptídeos e dois segundos polipeptídeos;

cada primeiro polipeptídeo compreendendo uma cadeia pesada de imunoglobulina composta de um domínio variável e domínios constantes;

cada segundo polipeptídeo compreendendo uma cadeia leve de imunoglobulina composta de um domínio variável e um domínio constante;

em que os dois primeiros polipeptídeos e os dois segundos polipeptídeos se associam estavelmente para formar uma molécula de tipo de
5 imunoglobulina;

em que os domínios variáveis das cadeias pesadas de imunoglobulina se associam estavelmente com os domínios variáveis das cadeias leves de imunoglobulina para formar primeiros sítios de ligação a antígeno; e

10 em que um ou ambos dentre os referidos primeiro e segundo polipeptídeos ainda compreende um segundo sítio de ligação a antígeno de domínio variável de cadeia única (sVD) no término N ou término C.

5. Proteína de ligação a antígeno de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 4, caracterizada pelo fato de que referidos primeiros
15 sítios de ligação a antígeno e referidos segundos sítios de ligação a antígeno tem diferentes especificidades.

6. Proteína de ligação a antígeno de acordo com a reivindicação 5, caracterizada pelo fato de que referidas especificidades diferentes são para epítopos que residem em diferentes antígenos.

20 7. Proteína de ligação a antígeno de acordo com a reivindicação 5, caracterizada pelo fato de que as referidas diferentes especificidades são para epítopos que residem no mesmo antígeno.

8. Proteína de ligação a antígeno de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 e 2, caracterizada pelo fato de que referidos primeiros
25 sítios de ligação a antígeno e referidos segundos sítios de ligação a antígeno tem a mesma especificidade.

9. Proteína de ligação a antígeno de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 4, caracterizada pelo fato de que referidos domínios constantes são domínios constantes humanos.

10. Proteína de ligação a antígeno de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 4, caracterizada pelo fato de que referido domínio variável único é humano.

5 11. Proteína de ligação a antígeno de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 4, caracterizada pelo fato de que liga a um receptor de Fc.

12. Proteína de ligação a antígeno de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 4, caracterizada pelo fato de que influencia a citotoxicidade dependente de complemento (CDC).

10 13. Proteína de ligação a antígeno de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 4, caracterizada pelo fato de que influencia a citotoxicidade mediada por célula dependente de anticorpo (ADCC).

15 14. Proteína de ligação a antígeno de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 4, caracterizada pelo fato de que é ligada a um agente anti-tumor.

15. Proteína de ligação a antígeno de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 4, caracterizada pelo fato de que é ligada a um agente de produção de sinal detectável.

20 16. Proteína de ligação a antígeno de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 4, caracterizada pelo fato de que pelo menos um dos referidos primeiro e segundo sítios de ligação a antígeno é específico para um receptor de tirosina quinase (RTK).

25 17. Proteína de ligação a antígeno de acordo com a reivindicação 16, caracterizada pelo fato de que bloqueia a ligação de ligando ao receptor de tirosina quinase.

18. Proteína de ligação a antígeno de acordo com a reivindicação 16, caracterizada pelo fato de que neutraliza a ativação do receptor de tirosina quinase.

19. Proteína de ligação a antígeno de acordo com a

reivindicação 16, caracterizada pelo fato de que inibe a transdução de sinal pelo receptor de tirosina quinase.

5 20. Proteína de ligação a antígeno de acordo com a reivindicação 16, caracterizada pelo fato de que o receptor de tirosina quinase é humano.

21. Proteína de ligação a antígeno de acordo com a reivindicação 16, caracterizada pelo fato de que o receptor de tirosina quinase é selecionado dentre o grupo consistindo de PDGFR α , VEGFR1, VEGFR2, VEGFR3, EGFR, HER2, IGFR, FGFR, NGFR, RON, Tek e Tie2.

10 22. Proteína de ligação a antígeno de acordo com a reivindicação 16, caracterizada pelo fato de que um dos referidos primeiro e segundo sítios de ligação a antígeno é específico para PDGFR α e o outro dos referidos primeiro e segundo sítios de ligação a antígeno é específico para VEGFR2.

15 23. Proteína de ligação a antígeno de acordo com a reivindicação 16, caracterizada pelo fato de que um dos referidos primeiro e segundo sítios de ligação a antígeno é específico para VEGFR1 e o outro dos referidos primeiro e segundo sítios de ligação a antígeno é específico para VEGFR2.

20 24. Proteína de ligação a antígeno de acordo com a reivindicação 16, caracterizada pelo fato de que um dos referidos primeiro e segundo sítios de ligação a antígeno é específico para IGFR e o outro de referidos primeiro e segundo sítios de ligação a antígeno é específico para EGFR ou HER2.

25 25. Método de neutralização da ativação de um receptor de tirosina quinase, caracterizado pelo fato de compreender o tratamento de uma célula com uma proteína de ligação a antígeno como definida em qualquer uma das reivindicações 1 a 4 específico para referido receptor de tirosina quinase em uma quantidade suficiente para neutralizar a ativação do receptor.

26. Método de inibição de angiogênese, caracterizado pelo fato de compreender o tratamento de um mamífero com uma proteína de ligação a antígeno como definida em qualquer uma das reivindicações 1 a 4, em uma quantidade suficiente para neutralizar a ativação do receptor.

5 27. Método de redução de crescimento de tumor, caracterizado pelo fato de compreender o tratamento de um mamífero com uma proteína de ligação a antígeno como definida em qualquer uma das reivindicações 1 a 4, em uma quantidade suficiente para reduzir o crescimento do tumor.

10 28. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 26 e 27, caracterizado pelo fato de que a proteína de ligação a antígeno se liga a PDGFR α e a VEGFR2 e inibe a ativação induzida por ligando de PDGFR α e a ativação induzida por ligando de VEGFR2.

15 29. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 26 e 27, caracterizado pelo fato de que a proteína de ligação a antígeno se liga a VEGFR1 e a VEGFR2 e inibe a ativação induzida por ligando de VEGFR1 e ativação induzida por ligando de VEGFR2.

20 30. Método de acordo com a reivindicação 27, caracterizado pelo fato de que a proteína de ligação a antígeno se liga a EGFR e a IGFR e inibe a ativação induzida por ligando de EGFR e ativação induzida por ligando de IGFR.

31. Método de acordo com a reivindicação 27, caracterizado pelo fato de que a proteína de ligação a antígeno se liga a HER2 e a IGFR e inibe a ativação induzida por ligando de HER2 e ativação induzida por ligando de IGFR.

25 32. Método de acordo com a reivindicação 27, caracterizado pelo fato de ainda compreender a administração de uma quantidade eficaz de um agente anti-neoplásico.

33. Método de produção de uma proteína de ligação a antígeno, caracterizado pelo fato de compreender:

a) co-expressar em uma célula hospedeira

uma construção de DNA recombinante codificando um primeiro polipeptídeo tendo um primeiro sítio de ligação a antígeno localizado no término N de um domínio constante de cadeia leve de imunoglobulina (domínio C_L), referido domínio C_L capaz de associação estável com um primeiro domínio constante de cadeia pesada de imunoglobulina (domínio C_{H1}), e

uma construção de DNA recombinante codificando um segundo polipeptídeo tendo um segundo sítio de ligação a antígeno localizado no término N de um domínio C_{H1} , referido domínio C_{H1} seguido por um ou mais domínios constantes de cadeia pesada capazes de auto-associação estável;

em que pelo menos um de referido primeiro sítio de ligação a antígeno e referido segundo sítio de ligação a antígeno é um domínio variável único (sVD);

durante um tempo e em um modo suficiente para permitir a expressão dos polipeptídeos e a formação do anticorpo; e

b) recuperar a proteína de ligação a antígeno.

34. Método de acordo com a reivindicação 33, caracterizado pelo fato de que as construções são no mesmo vetor de expressão de DNA.

35. Método de acordo com a reivindicação 33, caracterizado pelo fato de que as construções são em diferentes vetores de expressão de DNA.

36. Método de acordo com a reivindicação 33, caracterizado pelo fato de que a célula hospedeira é uma célula bacteriana, uma célula de levedura ou uma célula de mamífero.

37. Método de acordo com a reivindicação 33, caracterizado pelo fato de que o anticorpo é secretado da célula hospedeira.

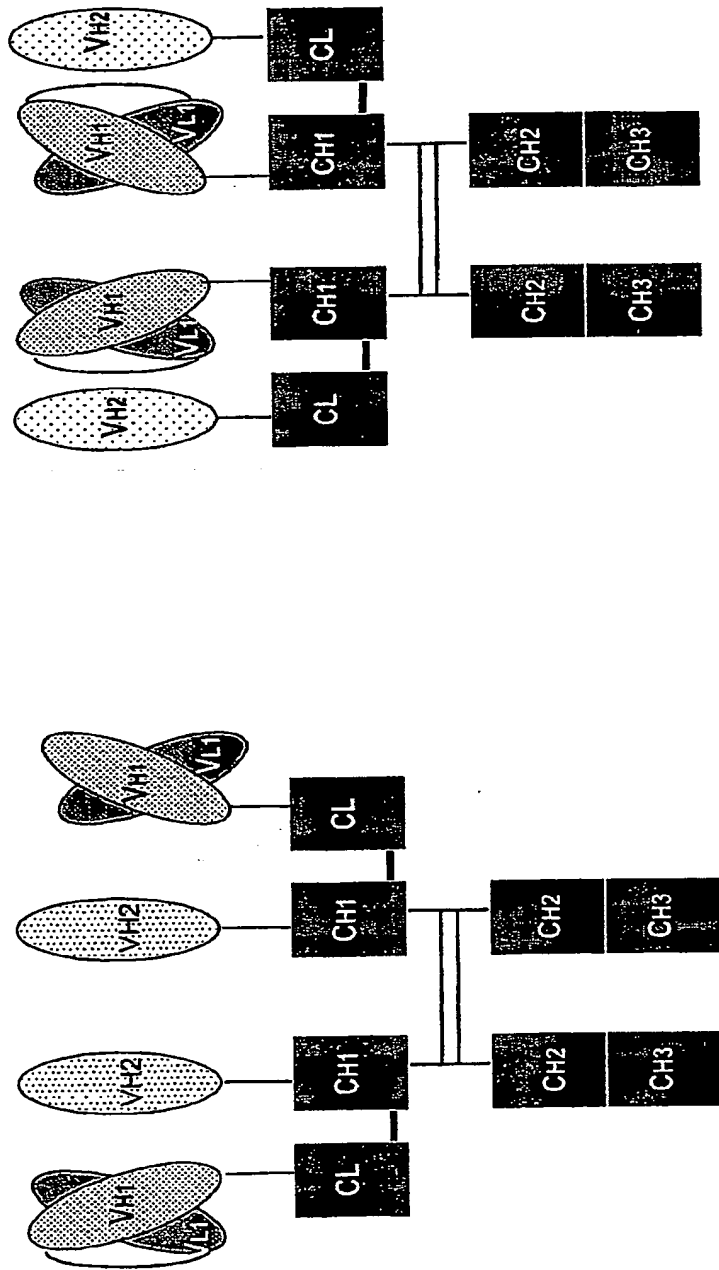


Fig. 1A

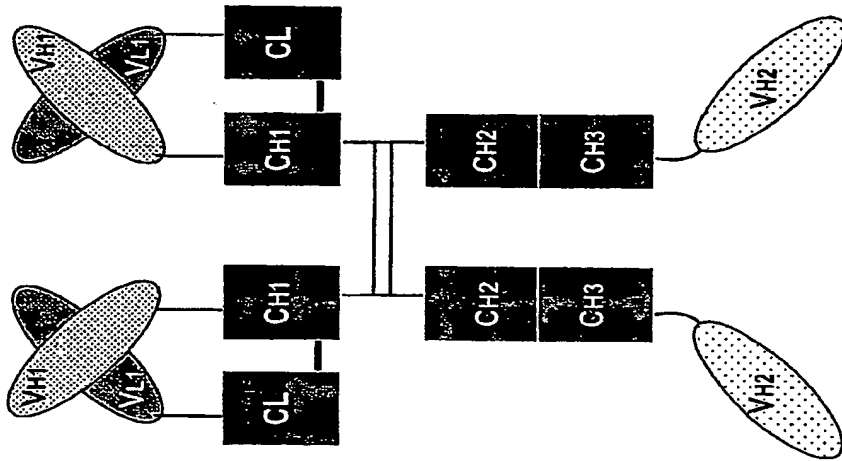
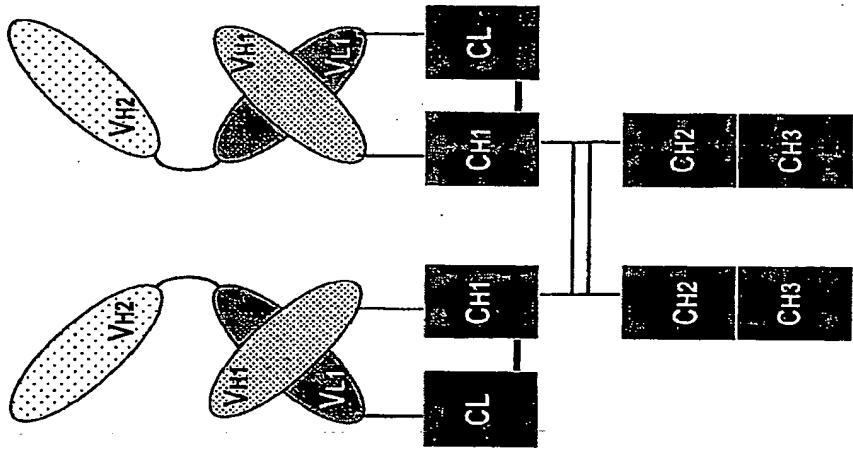


Fig. 1B

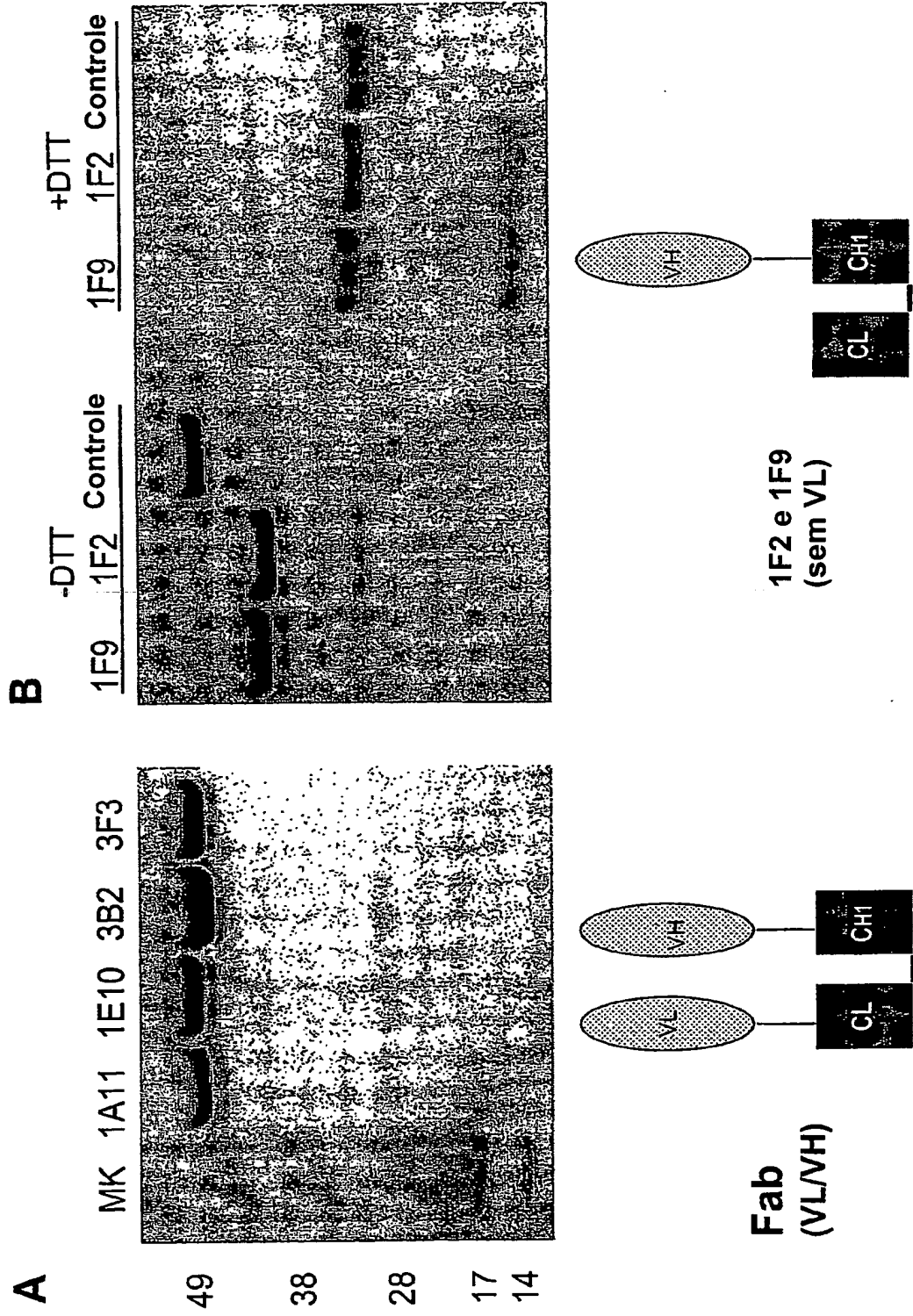
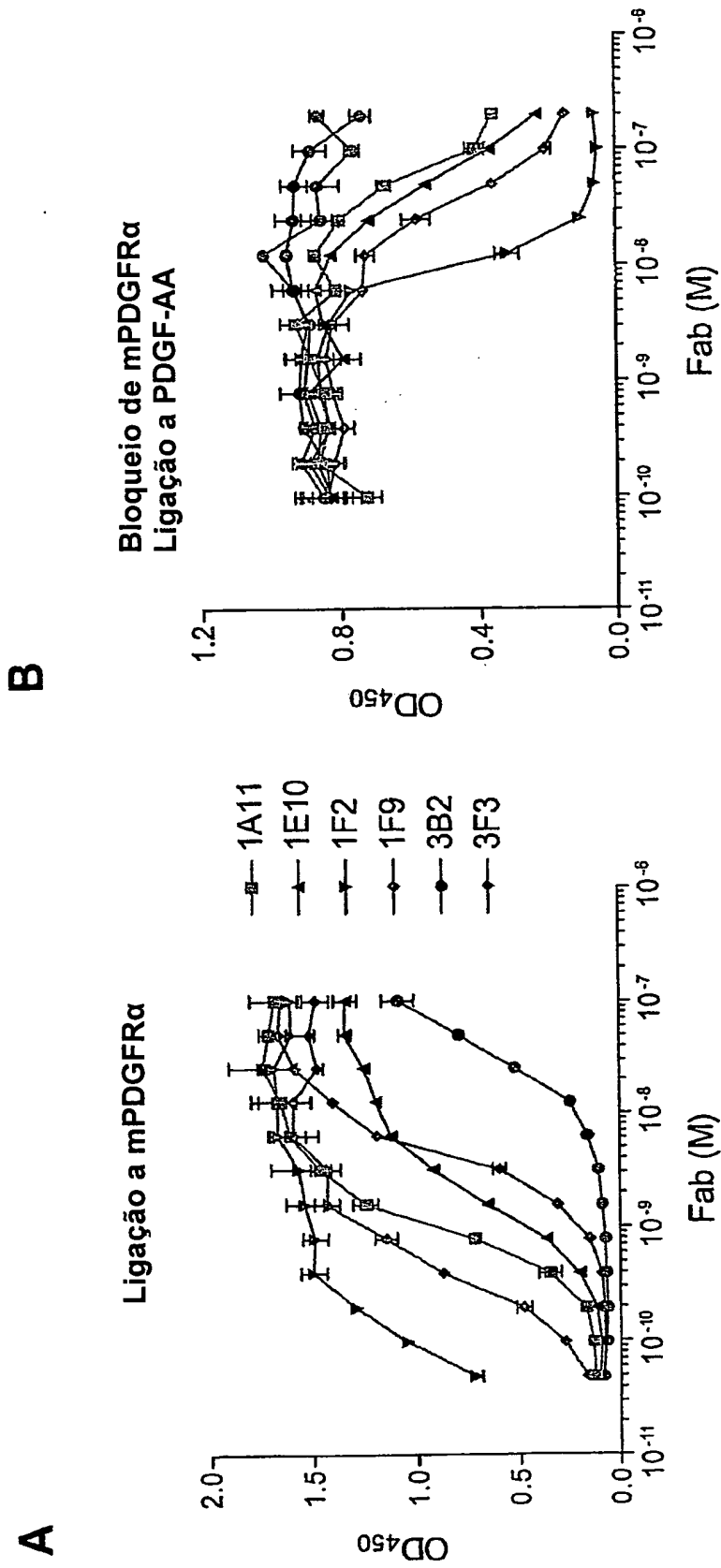


Fig. 2

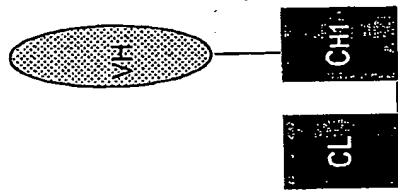


Fabs anti-mPDGFR α

Monovalente

➤ 1F2

CL
1F2-VH--CH₁



Bivalente

➤ 1F2-2H Fab

1F2-VH--CL
1F2-VH--CH₁

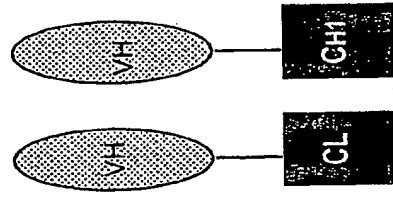


Fig. 4

Análise SDS-PAGE de Fabs

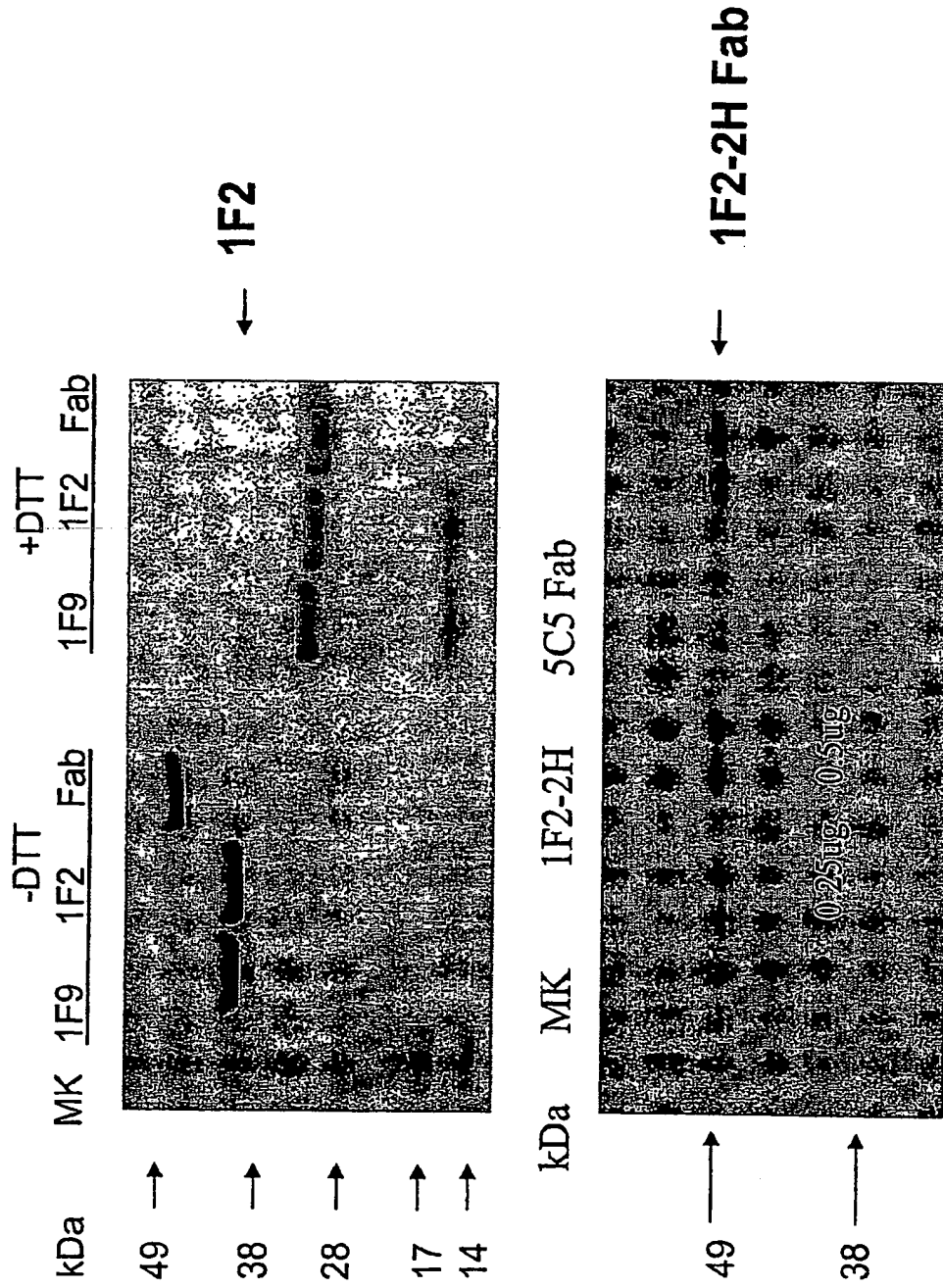


Fig. 5

Atividade de Fab 1F2-2H



Fig. 6

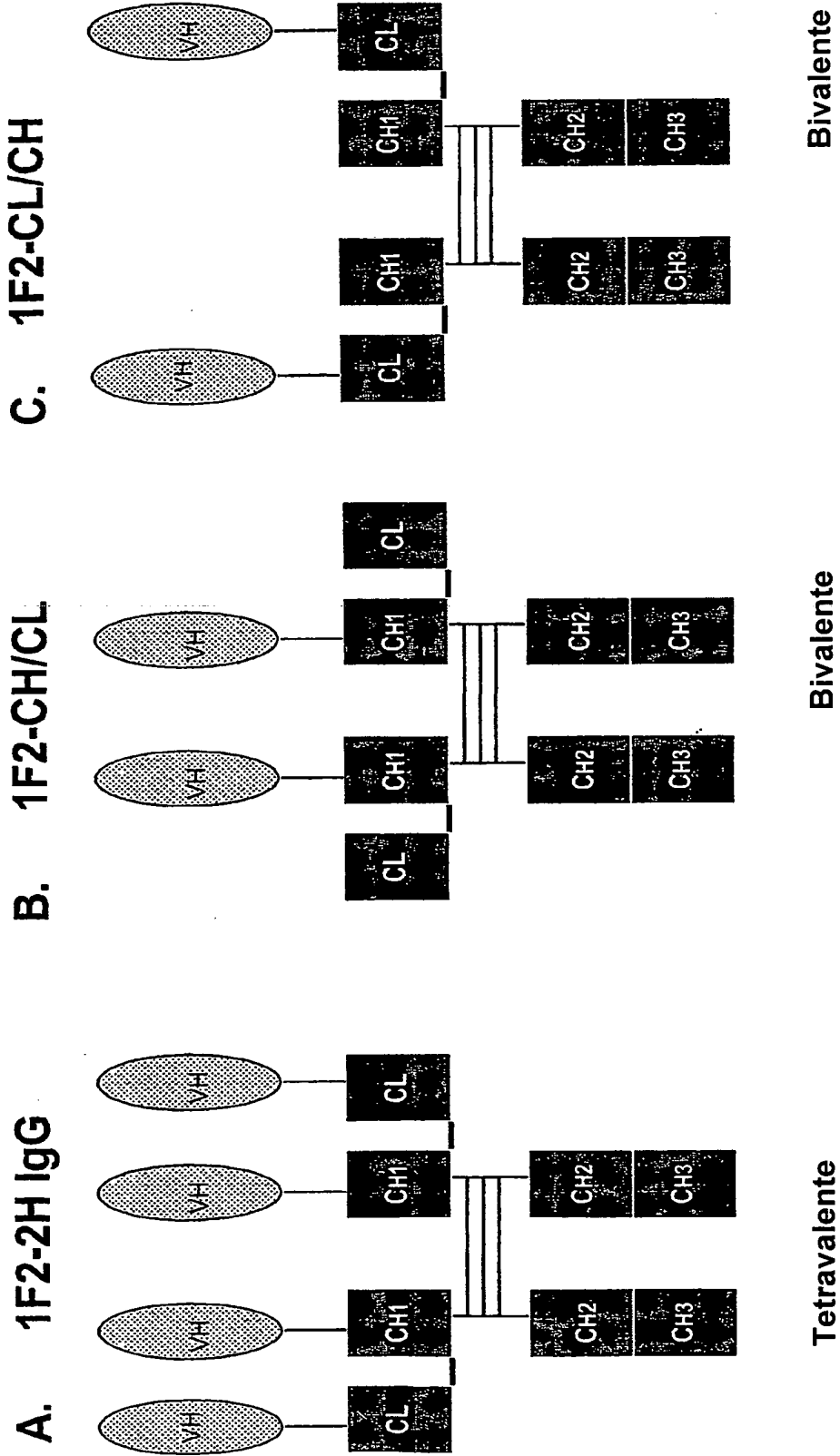


Fig. 7

Ik 1F2-CL 1F2-CH 1E10 2B4 -DTT +DTT 1F2-CL 1F2-CH 1E10 2B4

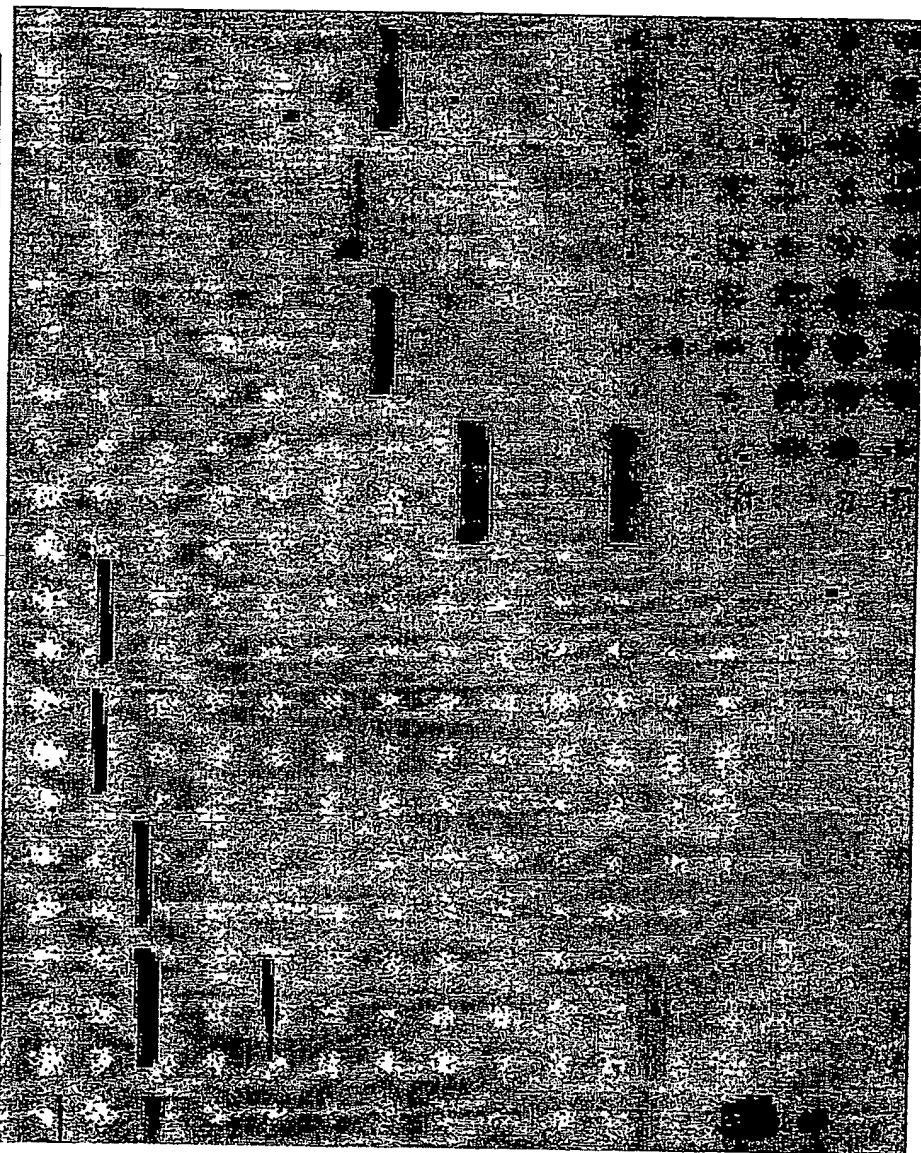


Fig. 8

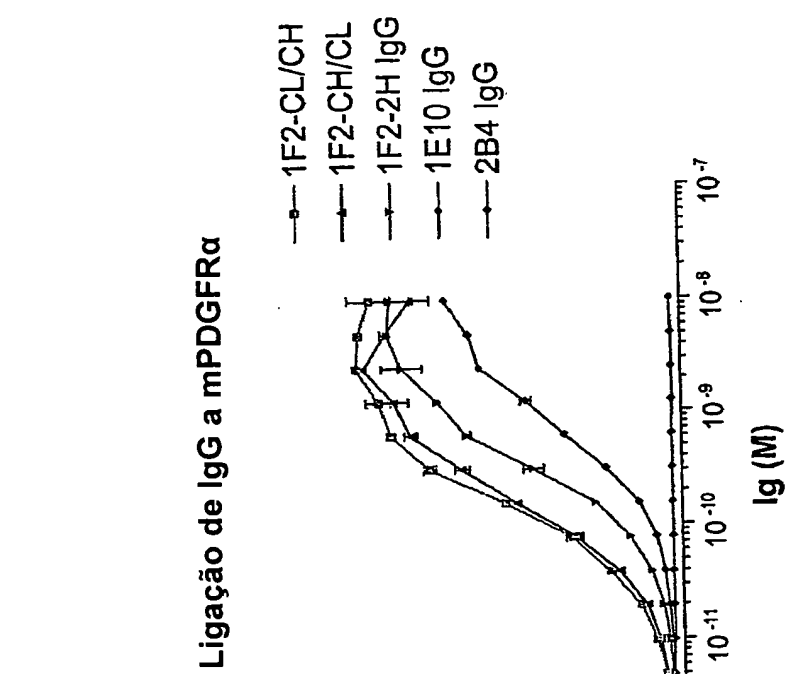
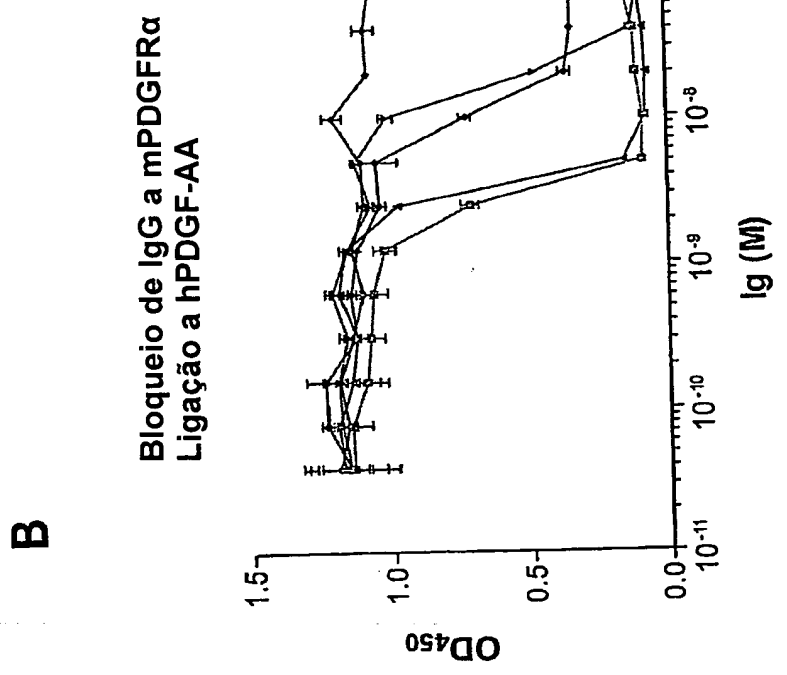


Fig. 9

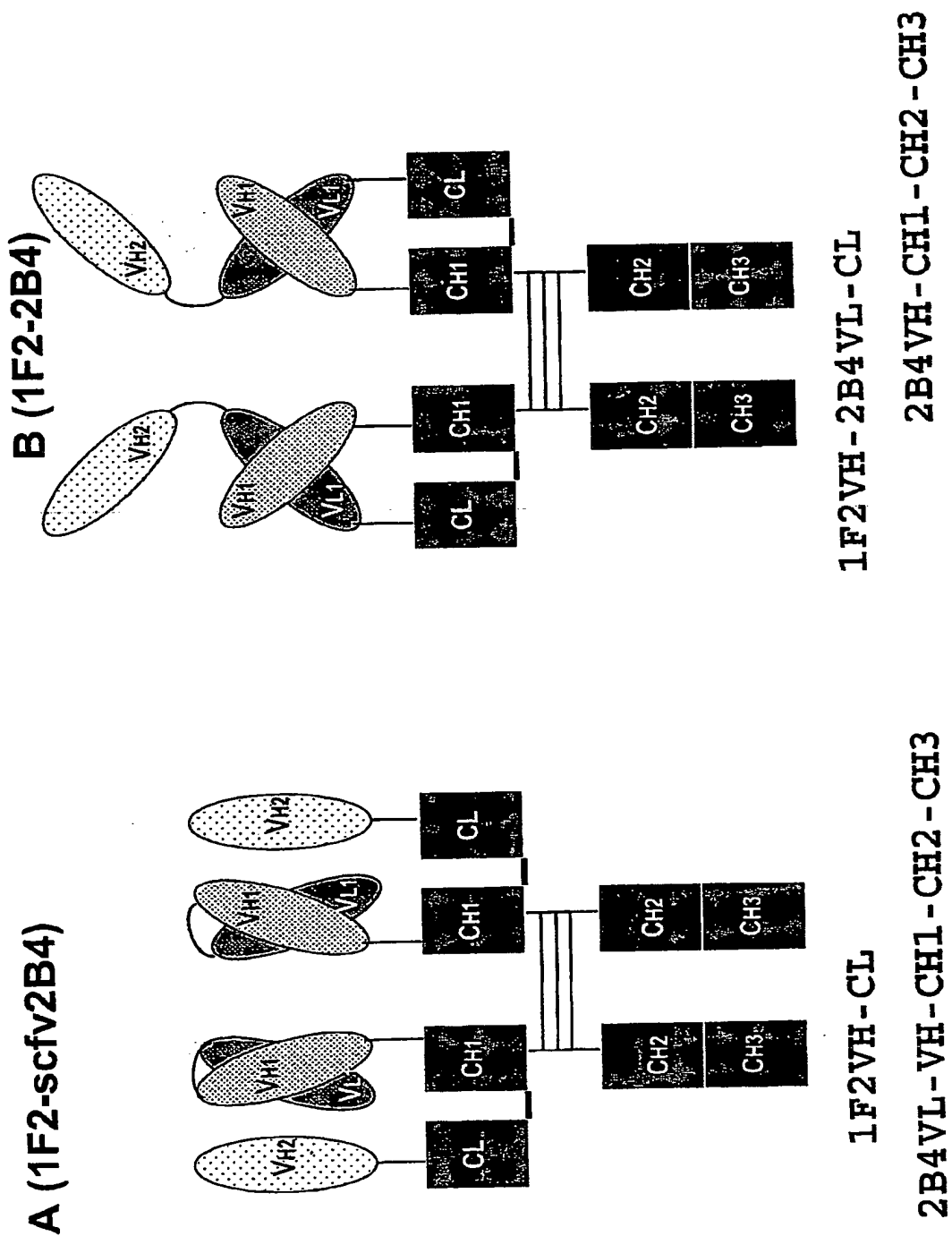


Fig. 10

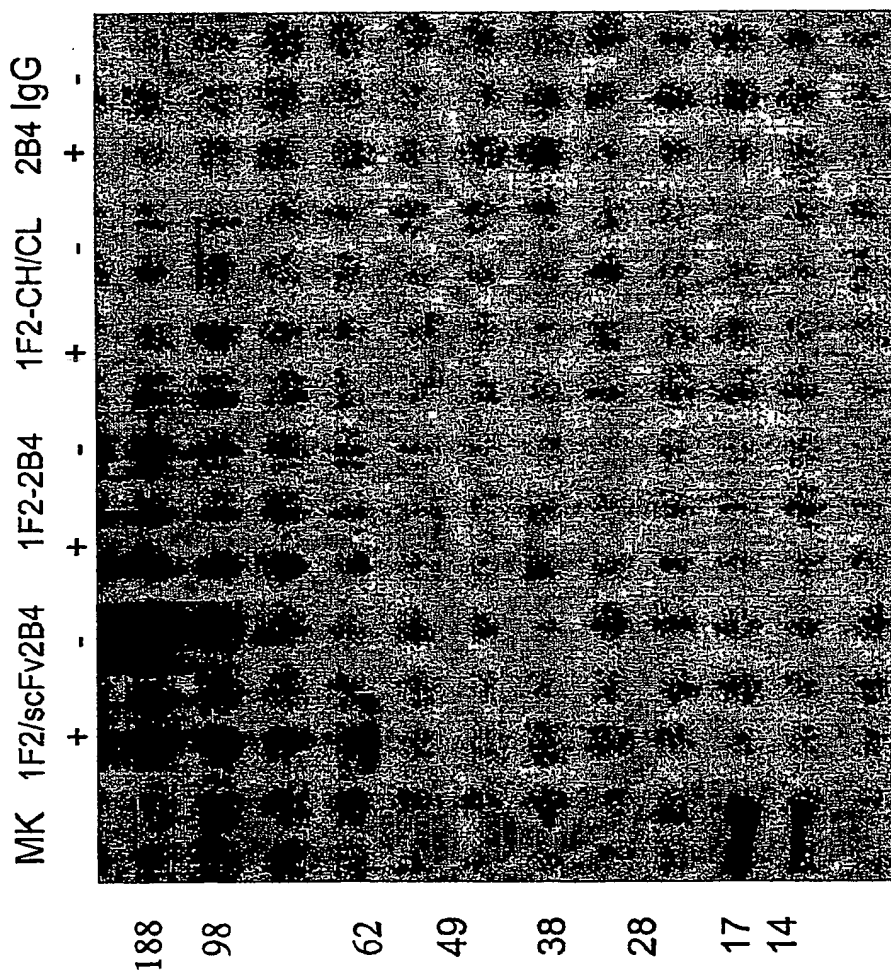


Fig. 11

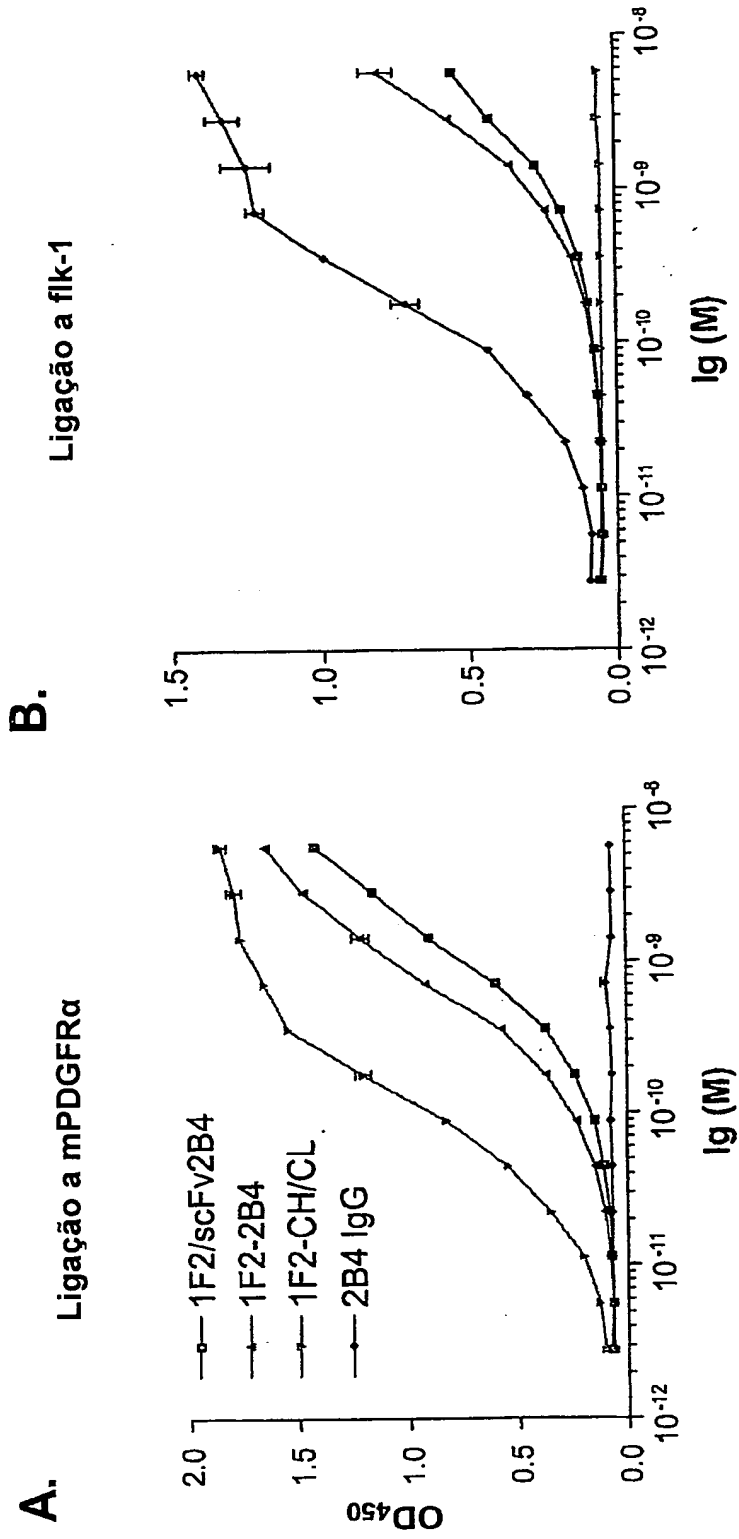
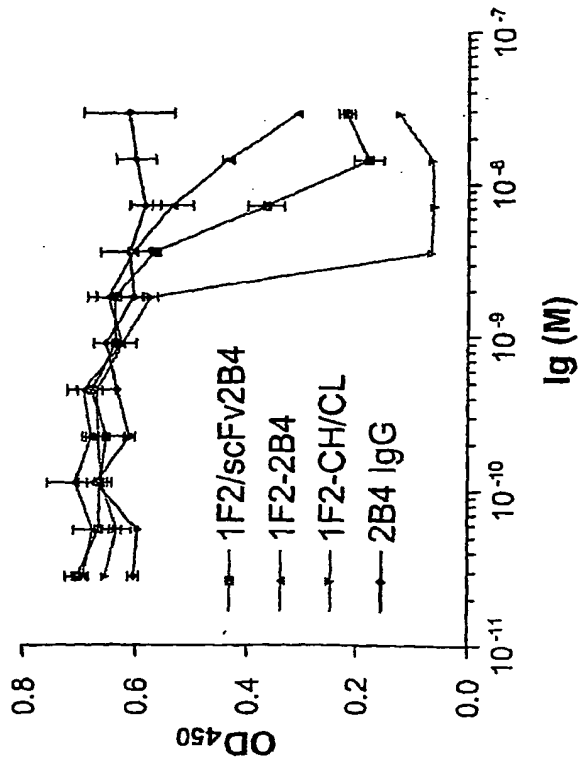


Fig. 12

A.

Bloqueio de mPDGFR α
Ligação a PDGF-AA



B.

Bloqueio de flk-1
Ligação a VEGF165

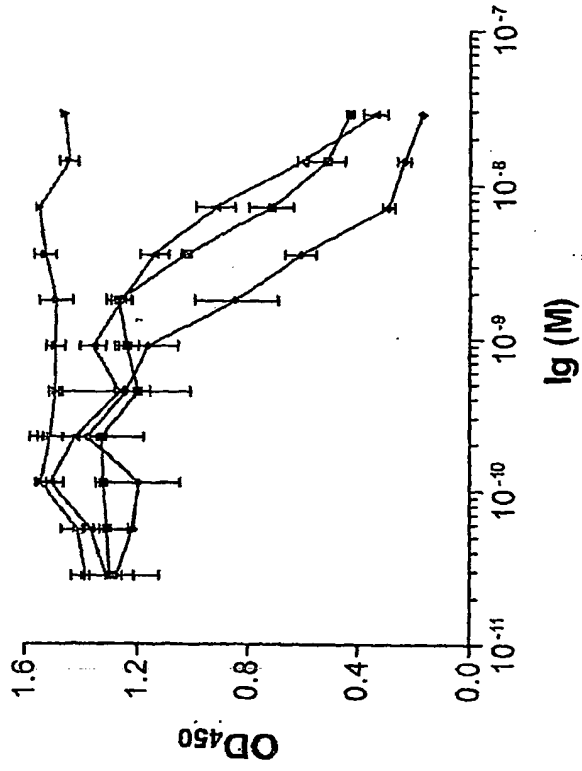


Fig. 13

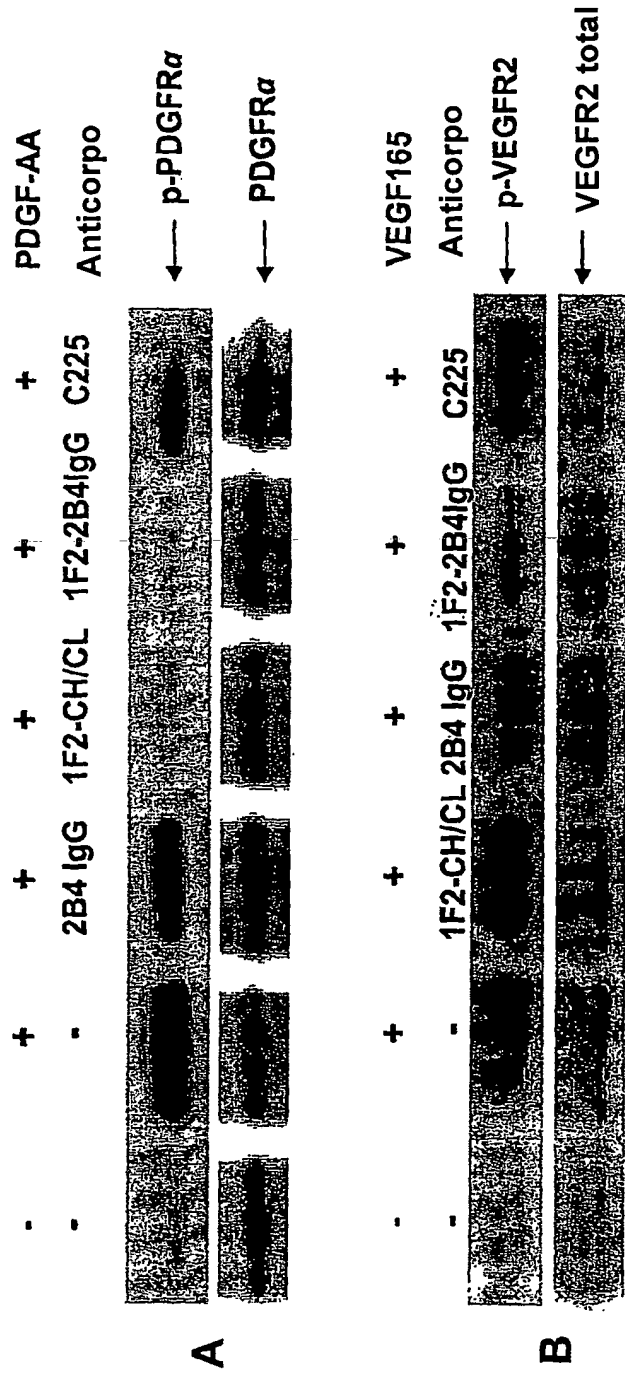


Fig. 14

```

VH |-----FR1-----|-----CDR1-----|-----FR2-----|-----CDR2-----|-----FR3-----|-----CDR3-----|-----FR4-----|
1E10 QVQLQQSGPGLVKPSQTLTLTCAISGDNVSSNSATWNIWIRQSPSRGLEWLGRTYYRSKWYNEYAVSVKSRITINGDTSKNQFSLQNSVTPDPTAVYYCARGYRESHWYDYWGIGTLVTVSS
1A11 QVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGGSISSYYWGWIRQPPGKGLEWIGSIYTGSSY. . . YNPSLKSRTVTSIDTSKNFSLKLSSTAAADTAVYYCARAGGSSWTFDP. . WGGGTLVTVSS
3B2 EVQLVQSGGGLVQPGSLRLSCAASGFTVSS. . . NYISWVRQAPGKGLEWVSVI. . YSGGS. . TYIADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNLSRAEDTAVYYCARGQWLG. . . FDIWGGQTLVTVSS
1C10 EVQLVQSGAEVKKPGASVKVKCKASGYTF. . . YGISWVRQAPGQGLEWVWGWISAYNGN. . TNYAQKLGQRVTMTDTSSTAYMELRSLRSDDTAVYYCARGYGSYQKRRFDYWGQGTLLVTVSS
3G7 EVQLVQSGAEVKKPGASVKVFCCKASGYTF. . . YIMHWVRQAPGQGLEWVWGWINPNSGG. . TNYAQKFGQGRVTMTDTSSTAYMELRSLRSDDTAVYYCARAPWSGRRRFDYWGQGTLLVTVSS
1F9 EVQLVQSEAEVKKPGASVKVKCKASGYTF. . . YAMHWVRQAPGQGLEWVWGWINAGNGN. . TKYSQKFGQGRVTITRDTSSTAYMELRSLRSDDTAVYYCARGYGSYQKRRFDYWGQGTLLVTVSS
1F2 EVQLVQSGAEVKKPGASVKVKCKASGYTF. . . YGISWVRQAPGQGLEWVWGWISAYNGN. . TNYAQKLGQRVTMTDTSSTAYMELRSLRSDDTAVYYCARGYGSYQKRRFDYWGQGTLLVTVSS

2B4 QLQLQESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFSS. . . YGMHWVRQAPGKGLEWVAVIWDGSSN. . KYIADSVKGRFTISRDNSRNTLYLQMNLSRAEDTAVYYCATYFFGVVHN. . . WGGGTLVTVSS

VL |-----FR1-----|-----CDR1-----|-----FR2-----|-----CDR2-----|-----FR3-----|-----CDR3-----|-----FR4-----|
1E10 EFTLTQSPGTLSLSPGERGTLSCRSSQSV. . . TRNTLAWYQQKAGQAPRLLIYGASSRATGIPLRFSGSGSGTDFTLTISGLEPEDEPAVYFCQQYEIFSPTFEGGGTKVYIQR
1A11 DVVMTQSPDLSLPVTPGEPASISCSRSSLHSHNGYNYLDWYLQKPGQSPQLLIYLGSNRASGVDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYCMQALARTPLTFGGPGTKVDIKR
3B2 EFTLTQSPPTLSLSPGERATLSCRASQSV. . . SSSNLAWYQQKPGQAPRLLIYGASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDEPAVYICQQYGSLSLWTFGGGTKVYIQR
1C10 DIWVHTPLSLSVTPGQPASISCKSSQLLHSDGKTYLYWYLQKPGQPPQLLIYHVSNNRFSGVPERFSGSGSGTAFYTLKISRVEAEDVGVYCMQRIEFP. . . PHFRRRQGGDQINGCGCTICLHLPAI. . .
3G7 AW*
1F9 QVQLQE@. . . @LEIKR
1F2 QVQLQE@. . . @LEIKR

2B4 EIVLTQSPDLSLPVTPGEPASISCSRSSLHSHNGFNILDWYLQKPGQSPHLLIYFGSYRASGVDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGIYCMQNLQTPWTFGGGTKVDIKR

```

Fig. 15

RESUMO

5 “PROTEÍNA DE LIGAÇÃO A ANTÍGENO, E, MÉTODOS DE NEUTRALIZAÇÃO DA ATIVAÇÃO DE UM RECEPTOR DE TIROSINA QUINASE, DE INIBIÇÃO DE ANGIOGÊNESE, DE REDUÇÃO DE CRESCIMENTO DE TUMOR E DE PRODUÇÃO DE UMA PROTEÍNA DE LIGAÇÃO A ANTÍGENO”

10 A invenção é dirigida a novos anticorpos que compreende sítios de ligação de domínio único. Os anticorpos podem ser bivalentes ou multivalentes, e podem ser biespecíficos. A invenção é ainda dirigida a anticorpos monoespecíficos e biespecíficos, que ligam a mPDGFR α . Os anticorpos podem ser administrados sozinhos ou em combinação com drogas antiangiogênicas ou antineoplásicas.