



República Federativa do Brasil  
Ministério da Economia  
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

**(11) PI 0712222-5 B1**



**(22) Data do Depósito: 01/06/2007**

**(45) Data de Concessão: 13/10/2021**

**(54) Título:** PROTEÍNA DE LIGAÇÃO ISOLADA QUE SE LIGA AO FATOR DE CRESCIMENTO DE HEPATÓCITO HUMANO (HGF), SEU USO E MÉTODO DE PRODUÇÃO, ÁCIDO NUCLÉICO, VETOR DE EXPRESSÃO, CÉLULA HOSPEDEIRA, E MÉTODOS PARA PRODUZIR UM POLIPEPTÍDEO QUE COMPREENDE UMA REGIÃO VARIÁVEL DA CADEIA PESADA DE IMUNOGLOBULINA E PARA PRODUZIR UM POLIPEPTÍDEO QUE COMPREENDE UMA REGIÃO VARIÁVEL DA CADEIA LEVE DE IMUNOGLOBULINA

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

**(30) Prioridade Unionista:** 02/06/2006 US 60/810,714; 21/11/2006 US 60/860,509.

**(73) Titular(es):** AVEO PHARMACEUTICALS, INC.; XOMA TECHNOLOGY LTD..

**(72) Inventor(es):** MAY HAN; CHRISTINE KNUEHL; ARNOLD HORWITZ; JENO GYURIS; WILLIAM M. WINSTON; S. KIRK WRIGHT; LYNE BREAUULT; JIE LIN; BIJAN ETEMAD-GILBERTSON.

**(86) Pedido PCT:** PCT US2007012939 de 01/06/2007

**(87) Publicação PCT:** WO 2007/143090 de 13/12/2007

**(85) Data do Início da Fase Nacional:** 02/12/2008

**(57) Resumo:** PROTEÍNA DE LIGAÇÃO ISOLADA QUE SE LIGA AO FATOR DE CRESCIMENTO DE HEPATÓCITO HUMANO (HGF), ÁCIDO NUCLÉICO, VETOR DE EXPRESSÃO, CÉLULA HOSPEDEIRA, COMPOSIÇÃO COMPREENDENDO A REFERIDA PROTEÍNA BEM COMO SEUS USOS. A presente invenção refere-se uma família de proteínas de ligação que se ligam e neutralizam a atividade do fator de crescimento de hepatócito (HGF), em particular, HGF humano. As proteínas de ligação podem ser usadas como agentes de diagnóstico ou terapêuticos. Com relação a sua atividade terapêutica, as proteínas de ligação podem ser usadas para tratar certas desordens responsivas a HGF, por exemplo, certos tumores responsivos a HGF.

Relatório Descritivo da Patente de Invenção para  
**"PROTEÍNA DE LIGAÇÃO ISOLADA QUE SE LIGA AO FATOR DE CRESCIMENTO DE HEPATÓCITO HUMANO (HGF), SEU USO E MÉTODO DE PRODUÇÃO, ÁCIDO NUCLÉICO, VETOR DE EXPRESSÃO, CÉLULA HOSPEDEIRA, E MÉTODOS PARA PRODUZIR UM POLIPEPTÍDEO QUE COMPREENDE UMA REGIÃO VARIÁVEL DA CADEIA PESADA DE IMUNOGLOBULINA E PARA PRODUZIR UM POLIPEPTÍDEO QUE COMPREENDE UMA REGIÃO VARIÁVEL DA CADEIA LEVE DE IMUNOGLOBULINA".**

#### PEDIDOS RELACIONADOS

[0001] Esse pedido reivindica o benefício e prioridade dos Pedidos Provisórios US 60/810,714, depositado em 2 de junho de 2006 e US 60/860,509, depositado em 21 de novembro de 2006, cujas descrições estão incorporadas aqui por referência.

#### CAMPO DA INVENÇÃO

[0002] O campo da invenção é de biologia molecular, imunologia e oncologia. Mais particularmente, o campo é de proteínas ligantes baseadas em anticorpo que se ligam ao fator de crescimento do hepatócito humano (HGF).

#### ANTECEDENTES

[0003] O Fator de Crescimento de Hepatócito (HGF), também conhecido como Fator de Dispersão (SF), é uma proteína heterodimérica multifuncional produzida predominantemente por células mesenquimais e é um efator de células que expressam o receptor Met de tirosina quinase (Bottaro *et al.* (1991) SCIENCE 251: 802-804, Rubin *et al.* (1993) BIOCHIM. BIOPHYS. ACTA 1155: 357-371). O receptor Met humano também é conhecido como "c-Met". HGF maduro contém duas cadeias de polipeptídeos, a cadeia  $\alpha$  e a cadeia  $\beta$ . Estudos publicados sugerem que é a cadeia  $\alpha$  que contém o domínio de ligação do receptor c-Met de HGF.

[0004] Quando se liga ao seu receptor cognato, HGF medeia várias atividades celulares. A via de sinalização HGF-Met desempenha um papel na regeneração hepática, cicatrização de lesão, regeneração neural, angiogênese e malignidades. Veja, por exemplo, Cao *et al.* (2001) PROC. NATL. ACAD. SCI. USA 98: 7443-7448, Burgess *et al.* (2006) CANCER RES. 66: 1721-1729, e Patentes US 5.997.868 e US 5.707.624. Pesquisadores têm desenvolvido vários moduladores de HGF, incluindo anticorpos para tratar várias desordens que envolvem atividade de HGF, por exemplo, certos cânceres responsivos a HGF. Veja, por exemplo, Publicação de Pedido Internacional Nº WO 2005/017107.

[0005] A estrutura básica comum para todos os anticorpos é mostrada esquematicamente na Figura 1. Anticorpos são proteínas multiméricas que contêm quatro cadeias de polipeptídeos. Duas das cadeias de polipeptídeo são chamadas de cadeias pesadas ou H e duas das cadeias de polipeptídeos são chamadas de cadeias leves ou L. As cadeias pesada e leve de imunoglobulina são conectadas por uma ligação de dissulfeto entre as cadeias. As cadeias pesadas de imunoglobulina são conectadas por várias pontes de dissulfeto entre as cadeias. Uma cadeia leve é composta de uma região variável ( $V_L$  na Figura 1) e uma região constante ( $C_L$  na Figura 1), enquanto que a cadeia pesada é composta de uma região variável ( $V_H$  na Figura 1) e pelo menos três regiões constantes ( $CH_1$ ,  $CH_2$  e  $CH_3$  na Figura 1). As regiões variáveis determinam a especificidade do anticorpo e as regiões constantes têm outras funções.

[0006] A informação estrutural e dos aminoácidos indica que cada região variável compreende três regiões hipervariáveis (também conhecidas como regiões de determinação de complementaridade ou CDRs) flanqueadas por quatro regiões de arcabouço relativamente conservadas ou FRs. As três CDRs, referidas como  $CDR_1$ ,  $CDR_2$ , e

CDR<sub>3</sub>, são responsáveis pela especificidade de ligação de anticorpos individuais. Quando os anticorpos são para serem usados como agentes de diagnóstico e terapêuticos, tipicamente é desejável criar anticorpos que tem a maior especificidade de ligação e afinidade com a molécula alvo. Acredita-se que diferenças nas regiões variáveis possam ter efeitos profundos sobre a especificidade e a afinidade do anticorpo.

[0007] Patente US 5.707.624 descreve o uso de anticorpos anti-HGF no tratamento do sarcoma de Kaposi. Similarmente, a Patente US 5.997.868 descreve o tratamento de um tumor pela administração de um anticorpo anti-HGF ao paciente a ser tratado a fim de bloquear a habilidade de HGF endógeno de promover angiogênese no tumor. Mais recentemente, pesquisadores propuseram que anticorpos que se ligam a cadeia  $\beta$  de HGF podem ter potencial como agentes terapêuticos em pacientes com tumores dependentes de HGF (Burgess (2006) *supra*).

[0008] Apesar disso, ainda há uma necessidade de moduladores adicionais de HGF que possam ser usados como agente terapêutico e diagnóstico.

### SUMÁRIO DA INVENÇÃO

[0009] A invenção é baseada, em parte, na constatação de uma família de proteínas de ligação que se ligam especificamente a HGF, em particular, a HGF humano. As proteínas de ligação são baseadas em anticorpo à medida que elas contêm sítios de ligação de antígeno (isto é, HGF) baseados nas CDRs de uma família de anticorpos que se ligam especificamente a HGF. As proteínas de ligação podem ser usadas como agentes de diagnóstico e terapêuticos. Quando usadas como agente terapêutico, as proteínas de ligação são manipuladas (por exemplo, humanizadas) a fim de reduzir ou eliminar o risco de indução de resposta imune contra a proteína de ligação quando



administrada ao receptor (por exemplo, um ser humano).

[00010] As proteínas de ligação neutralizam a atividade de HGF e, portanto, podem ser usadas como um agente terapêutico. Em certas modalidades, as proteínas de ligação impedem que HGF se ligue ao seu receptor cognato, c-Met, neutralizando dessa forma a atividade de HGF. Em outras modalidades, as proteínas de ligação se ligam a HGF e neutralizam sua atividade biológica, mas sem evitar que HGF se ligue ao receptor c-Met. Como HGF tem sido implicado no crescimento e proliferação de células cancerosas, as proteínas de ligação podem ser usadas para inibir a proliferação de células cancerosas. Além disso, quando administradas a um mamífero, as proteínas de ligação podem inibir ou reduzir o crescimento do tumor no mamífero.

[00011] Esses e outros aspectos e vantagens da invenção se tornarão claros após a consideração das seguintes figuras, descrição detalhada e reivindicações.

#### DESCRIÇÃO DOS DESENHOS

[00012] A invenção pode ser mais completamente compreendida com referência as seguintes figuras.

[00013] Figura 1 é uma representação esquemática de um anticorpo típico.

[00014] Figura 2 é um diagrama esquemático mostrando a sequência de aminoácidos que define a região variável da cadeia pesada da imunoglobulina completa dos anticorpos indicados como 1A3, 1D3, 1F3, 2B8, 2F8, 3A12, 3B6 e 3D11. As sequências de aminoácidos de cada anticorpo estão alinhadas uma contra outra e as regiões que definem o peptídeo de sinal, CDR<sub>1</sub>, CDR<sub>2</sub>, e CDR<sub>3</sub> estão identificadas em retângulos. As sequências fora dos retângulos representam sequências de FR.

[00015] Figura 3 é um diagrama esquemático que mostra as sequências de CDR<sub>1</sub>, CDR<sub>2</sub>, e CDR<sub>3</sub> de cada uma das sequências da

região variável da cadeia pesada de imunoglobulina apresentadas na Figura 2.

[00016] Figura 4 é um diagrama esquemático que mostra a sequência de aminoácidos que define a região variável da cadeia leve de imunoglobulina completa dos anticorpos 1A3, 1D3, 1F3, 2B8, 2F8, 3A12, 3B6, e 3D11. As sequências de aminoácidos de cada anticorpo estão alinhadas uma contra outra e as regiões que definem o peptídeo de sinal, CDR<sub>1</sub>, CDR<sub>2</sub>, e CDR<sub>3</sub> estão identificadas em retângulos. As sequências fora dos retângulos representam sequências FR.

[00017] Figura 5 é um diagrama esquemático que mostra as sequências de CDR<sub>1</sub>, CDR<sub>2</sub>, e CDR<sub>3</sub> de cada uma das sequências da região variável da cadeia leve de imunoglobulina apresentadas na Figura 4.

[00018] Figura 6 é um gráfico que resume os resultados de um experimento para medir a atividade inibitória de tumor de anticorpos anti-HGF 1D3, 1F3, 1A3 e 2B8 em um modelo de xenoinxerto de U87MG. Losangos correspondem a PBS; triângulos correspondem ao anticorpo 1A3 anti-HGF; X corresponde ao anticorpo 1D3 anti-HGF; quadrados correspondem ao anticorpo 1F3 anti-HGF e círculos correspondem ao anticorpo 2B8 anti-HGF.

[00019] Figura 7 é um gráfico que resume os resultados de um experimento para medir a atividade inibitória de tumor de anticorpos anti-HGF 1D3, 1F3, 1A3 e 2B8 em um modelo de xenoinxerto de U118. Losangos correspondem a IgG; quadrados correspondem ao anticorpo 1F3 anti-HGF, triângulos ao anticorpo 1D3 anti-HGF; X corresponde ao anticorpo 1A3 anti-HGF; e círculos correspondem ao anticorpo 2B8 anti-HGF.

[00020] Figura 8 é uma tabela que resume os dados de ressonância de plásmon de superfície sobre a afinidade de ligação ao antígeno e a cinética de interação entre HGF humano e anticorpos 2B8 quimérico,

quimérico/humanizado ou humanizado. A tabela lista os pares de cadeia leve Capa e cadeia pesada de IgG1 testados. Aqueles anticorpos com desvios-padrão (STDEV) listados foram analisados em três experimentos independentes.

[00021] Figura 9 é um gráfico de barras que resume dados experimentais que indicam que Hu2B8 se liga a um epítipo mutuamente exclusivo para o anticorpo monoclonal 2B8 de murino. 2B8 humanizado ou quimérico foi capturado sobre um chip de Fc anti-humano. Então, HGF estava ligado a 2B8 quimérico ou humanizado. A habilidade de 2B8 de camundongo ou do anticorpo de controle (anticorpo policlonal anti-HGF de cabra) se ligar a HGF capturado foi medida. Ambos os anticorpos 2B8 humanizado e 2B8 quimérico impedem que 2B8 de murino se ligue a HGF. As barras brancas correspondem ao anticorpo 2B8 quimérico; as barras cinzas correspondem ao anticorpo Hu2B8 humanizado (região variável capa Kv 1-39.1 e região variável de cadeia pesada Hv5-51.1); as barras pretas correspondem ao anticorpo Hu2B8 humanizado (região variável capa Kv 3-15.1 e região variável de cadeia pesada Hv5-51.1).

#### DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO

[00022] A invenção é baseada, em parte, na contatação de uma família de proteínas de ligação que se ligam especificamente e neutralizam a atividade de HGF, em particular, HGF humano. As proteínas de ligação podem ser usadas em uma variedade de aplicações de diagnóstico e terapêuticas. As proteínas de ligação são baseadas nos sítios de ligação a antígeno de certos anticorpos monoclonais que foram selecionados por sua habilidade de se ligar e neutralizar a atividade de HGF. Em particular, as proteínas de ligação contêm sequências de região variável de CDR de imunoglobulina que juntas definem um sítio de ligação para HGF.

[00023] Em vista da atividade neutralizante desses anticorpos, eles

são particularmente úteis em modular o crescimento e/ou proliferação de células responsivas a HGF, por exemplo, células cancerosas. Quando usadas como um agente terapêutico, as proteínas de ligação podem ser manipuladas a fim de minimizar ou eliminar o risco de indução de resposta imune contra a proteína de ligação quando administrada ao receptor. Além disso, dependendo da aplicação particular, considera-se que as proteínas de ligação podem ser conjugadas com outras porções, por exemplo, marcadores detectáveis, por exemplo, radiomarcadores e moléculas efetoras, por exemplo, outra proteína e terapêuticos baseados em moléculas pequenas. Cada uma dessas características e aspectos da invenção é discutida em mais detalhes abaixo.

#### I – Proteínas de Ligação que se Ligam a HGF

[00024] Em um aspecto, a invenção fornece uma proteína de ligação isolada que se liga a HGF humano. A proteína de ligação compreende (i) uma região variável de cadeia leve de imunoglobulina que compreende a estrutura CDR<sub>L1</sub>-CDR<sub>L2</sub>-CDR<sub>L3</sub> e (ii) uma região variável de cadeia pesada de imunoglobulina que compreende três regiões de determinação de complementaridade (CDRs), em que a região variável de cadeia leve de imunoglobulina e a região variável de cadeia pesada de imunoglobulina juntas definem um sítio de ligação único para a ligação de HGF humano. CDR<sub>L1</sub> compreende a sequência de aminoácidos X<sub>1</sub> X<sub>2</sub> Ser X<sub>4</sub> X<sub>5</sub> X<sub>6</sub> X<sub>7</sub> X<sub>8</sub> X<sub>9</sub> X<sub>10</sub> X<sub>11</sub> X<sub>12</sub> X<sub>13</sub> X<sub>14</sub> X<sub>15</sub>, em que o aminoácido X<sub>1</sub> é Arg, Lys, ou Ser, X<sub>2</sub> é Ala ou Thr, X<sub>4</sub> é Glu, Gln, ou Ser, X<sub>5</sub> é Asn, Asp, ou Ser, X<sub>6</sub> é Ile ou Val, X<sub>7</sub> é Asp, Lys, Ser, Val, ou Tyr, X<sub>8</sub> é uma ligação peptídica ou Tyr, X<sub>9</sub> é uma ligação peptídica ou Asp, X<sub>10</sub> é uma ligação peptídica ou Gly, X<sub>11</sub> é uma ligação peptídica ou Asn, X<sub>12</sub> é uma ligação peptídica, Ile, ou Ser, X<sub>13</sub> é Asn ou Tyr, X<sub>14</sub> é Ile, Leu, Met, ou Val, X<sub>15</sub> é Ala, Asn, His, ou Ser. CDR<sub>L2</sub> compreende a sequência de aminoácidos X<sub>16</sub> X<sub>17</sub> X<sub>18</sub> X<sub>19</sub> X<sub>20</sub> X<sub>21</sub> X<sub>22</sub>,

em que o aminoácido  $X_{16}$  é Ala, Asp, Arg, Gly, ou Val,  $X_{17}$  é Ala, Thr, ou Val,  $X_{18}$  é Asn, Ser, ou Thr,  $X_{19}$  é Arg, Asn, Lys, ou He,  $X_{20}$  é Leu ou Arg,  $X_{21}$  é Ala, Asn, Glu, Val, ou Pro,  $X_{22}$  é Asp, Ser, ou Thr. CDR<sub>L3</sub> compreende a sequência de aminoácidos  $X_{23}$   $X_{24}$   $X_{25}$   $X_{26}$   $X_{27}$   $X_{28}$  Pro  $X_{30}$  Thr, em que o aminoácido  $X_{23}$  é Leu, Gly, ou Gln,  $X_{24}$  é His ou Gln,  $X_{25}$  é Phe, Ser, Trp, ou Tyr,  $X_{26}$  é Asp, Ile, Ser, Trp, ou Tyr,  $X_{27}$  é Gly, Glu, Asn, ou Ser,  $X_{28}$  é Asp, Asn, Phe, Thr, ou Tyr,  $X_{30}$  é Leu, Phe, Pro, ou Tyr.

[00025] Em outro aspecto, a invenção fornece uma proteína de ligação isolada que se liga a HGF humano que compreende (i) uma região variável de cadeia pesada de imunoglobulina que compreende a estrutura CDR<sub>H1</sub>-CDR<sub>H2</sub>-CDR<sub>H3</sub> e (ii) uma região variável de cadeia leve de imunoglobulina que compreende três regiões de determinação de complementaridade (CDRs), em que a região variável de cadeia pesada de imunoglobulina e a região variável de cadeia leve de imunoglobulina juntas definem um sítio de ligação único para a ligação de HGF humano. CDR<sub>H1</sub> compreende a sequência de aminoácidos  $X_1$  Tyr  $X_3$   $X_4$   $X_5$  em que o aminoácido  $X_1$  é Asp, Asn, Ser, ou Thr,  $X_3$  é Phe, Ser, Trp, ou Tyr,  $X_4$  é Ile, Leu, ou Met,  $X_5$  é Asn, His, ou Ser. CDR<sub>H2</sub> compreende a sequência de aminoácidos  $X_6$  Ile  $X_8$   $X_9$   $X_{10}$   $X_{11}$  Gly  $X_{13}$   $X_{14}$   $X_{15}$  Tyr  $X_{17}$   $X_{18}$   $X_{19}$   $X_{20}$   $X_{21}$   $X_{22}$ , em que o aminoácido  $X_6$  é Lys, Gln, Glu, Val, ou Tyr,  $X_8$  é Asn, Gly, Ser, Trp, ou Tyr,  $X_9$  é Ala, Pro ou Ser,  $X_{10}$  é Gly ou Thr,  $X_{11}$  é uma ligação peptídica, Asp, Asn, Gly, ou Ser,  $X_{13}$  é Asp, Asn, His, ou Ser,  $X_{14}$  é Ser ou Thr,  $X_{15}$  é Asn ou Tyr,  $X_{17}$  é Asn ou Pro,  $X_{18}$  é Ala, Asp, Gly, Gln, Glu, Pro, ou Ser,  $X_{19}$  é Asn, Lys, Met, ou Ser,  $X_{20}$  é Leu, Phe ou Val,  $X_{21}$  é Lys, Met, ou Gln,  $X_{22}$  is Asp, Gly ou Ser. CDR<sub>H3</sub> compreende a sequência de aminoácidos  $X_{23}$   $X_{24}$   $X_{25}$   $X_{26}$   $X_{27}$   $X_{28}$   $X_{29}$   $X_{30}$   $X_{31}$   $X_{32}$   $X_{33}$   $X_{34}$  Tyr, em que o aminoácido  $X_{23}$  é Arg, Asn, Gln, ou Glu,  $X_{24}$  é Gly, Leu, Arg, ou Tyr,  $X_{25}$  é uma ligação peptídica, Asp, ou Gly,  $X_{26}$  é uma ligação peptídica ou Gly,  $X_{27}$

é uma ligação peptídica ou Tyr, X<sub>28</sub> é uma ligação peptídica, Leu, ou Tyr, X<sub>29</sub> é uma ligação peptídica, Gly, Leu, Arg, ou Val, X<sub>30</sub> é uma ligação peptídica, Asp, Gly, ou Glu, X<sub>31</sub> é uma ligação peptídica, Asn, Arg, Ser, ou Tyr, X<sub>32</sub> é uma ligação peptídica, Ala, Gly, Ile, ou Tyr, X<sub>33</sub> is Met ou Phe, X<sub>34</sub> é Ala ou Asp.

[00026] Compreende-se que a proteína de ligação pode compreender tanto a sequências da cadeia leve de imunoglobulina quanto a cadeia pesada da imunoglobulina ou fragmentos destas, registrados acima. Além disso, compreende-se que a proteína de ligação pode ser um anticorpo intacto ou um fragmento de ligação ao antígeno deste ou um sítio de anticorpo biossintético.

[00027] Em certas modalidades, as sequências de CDR da cadeia leve de imunoglobulina e da cadeia pesada de imunoglobulina são interpostas com regiões de arcabouço (FR).

[00028] Em certas outras modalidades, as sequências de CDR da cadeia leve de imunoglobulina e da cadeia pesada de imunoglobulina são interpostas entre regiões de arcabouço humanas ou humanizadas.

[00029] Em outro aspecto, a invenção fornece uma proteína de ligação isolada que se liga especificamente a HGF humano. A proteína de ligação compreende: (a) uma região variável da cadeia leve de imunoglobulina que compreende a estrutura CDR<sub>L1</sub>-CDR<sub>L2</sub>-CDR<sub>L3</sub> e (b) uma região variável da cadeia pesada de imunoglobulina, em que a região variável da cadeia leve de imunoglobulina e a região variável da cadeia pesada de imunoglobulina juntas definem um sítio de ligação único para a ligação de HGF humano. A CDR<sub>L1</sub> compreende uma sequência selecionada do grupo que consiste em SEQ ID NO. 8 (**1A3**), SEQ ID NO. 18 (**2B8**), SEQ ID NO. 28 (**2F8**), SEQ ID NO. 38 (**3B6**), SEQ ID NO. 48 (**3D11**), SEQ ID NO. 58 (**1D3**), SEQ ID NO. 68 (**1F3**), e SEQ ID NO. 78 (**3A12**). A CDR<sub>L2</sub> compreende uma sequência selecionada do grupo que consiste em SEQ ID NO. 9 (**1A3**), SEQ ID

NO. 19 **(2B8)**, SEQ ID NO. 29 **(2F8)**, SEQ ID NO. 39 **(3B6)**, SEQ ID NO. 49 **(3D11)**, SEQ ID NO. 59 **(1D3)**, SEQ ID NO. 69 **(1F3)**, SEQ ID NO. 79 **(3A12)** e SEQ ID NO. 206 **(LRMR2B8LC)**. A CDR<sub>L3</sub> compreende uma sequência selecionada do grupo que consiste em SEQ ID NO. 10 **(1A3)**, SEQ ID NO. 20 **(2B8)**, SEQ ID NO. 30 **(2F8)**, SEQ ID NO. 40 **(3B6)**, SEQ ID NO. 50 **(3D11)**, SEQ ID NO. 60 **(1D3)**, SEQ ID NO. 70 **(1F3)**, e SEQ ID NO. 80 **(3A12)**. Ao longo do pedido e das reivindicações, as sequências caracterizadas por uma SEQ ID NO. particular, são acompanhadas em parênteses pelo anticorpo que foi a origem da sequência particular. Como exemplo, SEQ ID NO. 8 **(1A3)** indica que a SEQ ID NO: 8 é baseada na sequência presente no anticorpo 1A3.

[00030] Em uma modalidade, a proteína de ligação compreende uma região variável da cadeia leve de imunoglobulina que compreende uma CDR<sub>L1</sub> que compreende a sequência de SEQ ID NO. 8 **(1A3)**, uma CDR<sub>L2</sub> que compreende a sequência de SEQ ID NO. 9 **(1A3)** e uma CDR<sub>L3</sub> que compreende a sequência de SEQ ID NO. 10 **(1A3)**.

[00031] Em outra modalidade, a proteína de ligação compreende uma região variável da cadeia leve de imunoglobulina que compreende uma CDR<sub>L1</sub> que compreende a sequência de SEQ ID NO. 18 **(2B8)**, uma CDR<sub>L2</sub> que compreende a sequência de SEQ ID NO. 19 **(2B8)** ou SEQ ID NO. 206 **(LRMR2B8LC)** e uma CDR<sub>L3</sub> que compreende a sequência de SEQ ID NO. 20 **(2B8)**.

[00032] Em outra modalidade, a proteína de ligação compreende uma região variável da cadeia leve de imunoglobulina que compreende uma CDR<sub>L1</sub> que compreende a sequência de SEQ ID NO. 28 **(2F8)**, uma CDR<sub>L2</sub> que compreende a sequência de SEQ ID NO. 29 **(2F8)** e uma CDR<sub>L3</sub> que compreende a sequência de SEQ ID NO. 30 **(2F8)**.

[00033] Em outra modalidade, a proteína de ligação compreende uma região variável da cadeia leve de imunoglobulina que compreende uma CDR<sub>L1</sub> que compreende a sequência de SEQ ID NO. 38 **(3B6)**, uma CDR<sub>L2</sub> que compreende a sequência de SEQ ID NO. 39 **(3B6)** e uma CDR<sub>L3</sub> que compreende a sequência de SEQ ID NO. 40 **(3B6)**.

[00034] Em outra modalidade, a proteína de ligação compreende uma região variável da cadeia leve de imunoglobulina que compreende uma CDR<sub>L1</sub> que compreende a sequência de SEQ ID NO. 48 **(3D11)**, uma CDR<sub>L2</sub> que compreende a sequência de SEQ ID NO. 49 **(3D11)** e uma CDR<sub>L3</sub> que compreende a sequência de SEQ ID NO. 50 **(3D11)**.

[00035] Em outra modalidade, a proteína de ligação compreende uma região variável da cadeia leve de imunoglobulina que compreende uma CDR<sub>L1</sub> que compreende a sequência de SEQ ID NO. 58 **(1D3)**, uma CDR<sub>L2</sub> que compreende a sequência de SEQ ID NO. 59 **(1D3)** e uma CDR<sub>L3</sub> que compreende a sequência de SEQ ID NO. 60 **(1D3)**.

[00036] Em outra modalidade, a proteína de ligação compreende uma região variável da cadeia leve de imunoglobulina que compreende uma CDR<sub>L1</sub> que compreende a sequência de SEQ ID NO. 68 **(1F3)**, uma CDR<sub>L2</sub> que compreende a sequência de SEQ ID NO. 69 **(1F3)** e uma CDR<sub>L3</sub> que compreende a sequência de SEQ ID NO. 70 **(1F3)**.

[00037] Em outra modalidade, a proteína de ligação compreende uma região variável de cadeia leve de imunoglobulina que compreende uma CDR<sub>L1</sub> que compreende a sequência de SEQ ID NO. 78 **(3A12)**, uma CDR<sub>L2</sub> que compreende a sequência de SEQ ID NO. 79 **(3A12)** e uma CDR<sub>L3</sub> que compreende a sequência de SEQ ID NO. 80 **(3A12)**.



[00038] Em cada uma das modalidades anteriores, as sequências de CDR<sub>L1</sub>, CDR<sub>L2</sub>, e CDR<sub>L3</sub> preferivelmente são interpostas entre FRs de imunoglobulina humanas ou humanizadas. É compreendido que a proteína de ligação pode ser um anticorpo intacto, um fragmento deste que se liga a antígeno ou um sítio de anticorpo biossintético.

[00039] Em outro aspecto, a invenção fornece uma proteína de ligação isolada que se liga a HGF humano. A proteína de ligação compreende: (a) uma região variável de cadeia pesada de imunoglobulina que compreende a estrutura CDR<sub>H1</sub>-CDR<sub>H2</sub>-CDR<sub>H3</sub> e (b) uma região variável da cadeia leve de imunoglobulina, em que a região variável da cadeia pesada de imunoglobulina e a região variável da cadeia leve de imunoglobulina juntas definem um sítio de ligação único para a ligação de HGF humano. A CDR<sub>H1</sub> compreende uma sequência selecionada do grupo que consiste em SEQ ID NO. 5 (**1A3**), SEQ ID NO. 15 (**2B8**), SEQ ID NO. 25 (**2F8**), SEQ ID NO. 35 (**3B6**), SEQ ID NO. 45 (**3D11**), SEQ ID NO. 55 (**1D3**), SEQ ID NO. 65 (**1F3**), e SEQ ID NO. 75 (**3A12**); a CDR<sub>H2</sub> compreende uma sequência selecionada do grupo que consiste em SEQ ID NO. 6 (**1A3**), SEQ ID NO. 16 (**2B8**), SEQ ID NO. 26 (**2F8**), SEQ ID NO. 36 (**3B6**), SEQ ID NO. 46 (**3D11**), SEQ ID NO. 56 (**1D3**), SEQ ID NO. 66 (**1F3**), SEQ ID NO. 76 (**3A12**), SEQ ID NO. 202 (**Hu2B8 Hv1f.1**), SEQ ID NO. 203 (**Hu2B8 Hv5a.1** ou **Hu2B8 Hv5-51.1**), SEQ ID NO. 204 (**LR2B8HC**) e SEQ ID NO. 205 (**LRMR2B8HC**); a CDR<sub>H3</sub> compreende uma sequência selecionada do grupo que consiste em SEQ ID NO. 7 (**1A3**), SEQ ID NO. 17 (**2B8**), SEQ ID NO. 27 (**2F8**), SEQ ID NO. 37 (**3B6**), SEQ ID NO. 47 (**3D11**), SEQ ID NO. 57 (**1D3**), SEQ ID NO. 67 (**1F3**), e SEQ ID NO. 77 (**3A12**).

[00040] Em uma modalidade, a proteína de ligação compreende uma região variável da cadeia pesada de imunoglobulina que compreende: uma CDR<sub>H1</sub> que compreende a sequência de SEQ ID

NO. 5 (**1A3**); uma CDR<sub>H2</sub> que compreende a sequência de SEQ ID NO. 6 (**1A3**); e uma CDR<sub>H3</sub> que compreende a sequência de SEQ ID NO. 7 (**1A3**).

[00041] Em outra modalidade, a proteína de ligação compreende uma região variável da cadeia pesada de imunoglobulina que compreende: uma CDR<sub>H1</sub> que compreende a sequência de SEQ ID NO.15 (**2B8**); uma CDR<sub>H2</sub> que compreende a sequência de SEQ ID NO. 16 (**2B8**), SEQ ID NO. 202 (**Hu2B8 Hv1f.1**), SEQ ID NO. 203 (**Hu2B8 Hv5a.1** ou **Hu2B8 Hv5-51.1**), SEQ ID NO. 204 (**LR2B8HC**) ou SEQ ID NO. 205 (**LRMR2B8HC**); e uma CDR<sub>H3</sub> que compreende a sequência de SEQ ID NO. 17 (**2B8**).

[00042] Em outra modalidade, a proteína de ligação compreende uma região variável da cadeia pesada de imunoglobulina que compreende: uma CDR<sub>H1</sub> que compreende a sequência de SEQ ID NO.25 (**2F8**); uma CDR<sub>H2</sub> que compreende a sequência de SEQ ID NO. 26 (**2B8**), e uma CDR<sub>H3</sub> que compreende a sequência de SEQ ID NO. 27 (**2F8**).

[00043] Em outra modalidade, a proteína de ligação compreende uma região variável da cadeia pesada de imunoglobulina que compreende: uma CDR<sub>H1</sub> que compreende a sequência de SEQ ID NO.35 (**3B6**); uma CDR<sub>H2</sub> que compreende a sequência de SEQ ID NO. 36 (**3B6**), e uma CDR<sub>H3</sub> que compreende a sequência de SEQ ID NO. 37 (**3B6**).

[00044] Em outra modalidade, a proteína de ligação compreende uma região variável da cadeia pesada de imunoglobulina que compreende: uma CDR<sub>H1</sub> que compreende a sequência de SEQ ID NO.45 (**3D11**); uma CDR<sub>H2</sub> que compreende a sequência de SEQ ID NO. 46 (**3D11**), e uma CDR<sub>H3</sub> que compreende a sequência de SEQ ID NO. 47 (**3D11**).

[00045] Em outra modalidade, a proteína de ligação compreende

uma região variável da cadeia pesada de imunoglobulina que compreende: uma CDR<sub>H1</sub> que compreende a sequência de SEQ ID NO.55 (**1D3**); uma CDR<sub>H2</sub> que compreende a sequência de SEQ ID NO. 56 (**1D3**), e uma CDR<sub>H3</sub> que compreende a sequência de SEQ ID NO. 57 (**1D3**).

[00046] Em outra modalidade, a proteína de ligação compreende uma região variável da cadeia pesada de imunoglobulina que compreende: uma CDR<sub>H1</sub> que compreende a sequência de SEQ ID NO.65 (**1F3**); uma CDR<sub>H2</sub> que compreende a sequência de SEQ ID NO. 66 (**1F3**), e uma CDR<sub>H3</sub> que compreende a sequência de SEQ ID NO. 67 (**1F3**).

[00047] Em outra modalidade, a proteína de ligação compreende uma região variável da cadeia pesada de imunoglobulina que compreende: uma CDR<sub>H1</sub> que compreende a sequência de SEQ ID NO.75 (**3A12**); uma CDR<sub>H2</sub> que compreende a sequência de SEQ ID NO. 76 (**3A12**), e uma CDR<sub>H3</sub> que compreende a sequência de SEQ ID NO. 77 (**3A12**).

[00048] Em cada uma das modalidades anteriores, as sequências de CDR<sub>H1</sub>, CDR<sub>H2</sub>, e CDR<sub>H3</sub> preferivelmente são interpostas entre FRs de imunoglobulina humanas ou humanizadas. É compreendido que a proteína de ligação pode ser um anticorpo intacto, um fragmento de ligação ao antígeno deste ou um sítio de anticorpo biossintético.

[00049] Em outro aspecto, a invenção fornece uma proteína de ligação isolada que se liga a HGF humano. A proteína de ligação compreende uma região variável de cadeia pesada selecionada do grupo que consiste nos resíduos 20-141 de SEQ ID NO. 2 (**1A3**), resíduos 20-137 de SEQ ID NO. 12 (**2B8**), resíduos 20-137 de SEQ ID NO. 22 (**2F8**), resíduos 20-139 de SEQ ID NO. 32 (**3B6**), resíduos 20-132 de SEQ ID NO. 42 (**3D11**), resíduos 20-141 de SEQ ID NO. 52 (**1D3**), resíduos 20-141 de SEQ ID NO. 62 (**1F3**), e resíduos 20-141 de

SEQ ID NO. 72 **(3A12)** e uma região variável da cadeia leve de imunoglobulina selecionada do grupo que consiste nos resíduos 21-127 de SEQ ID NO. 4 **(1A3)**, resíduos 21-127 de SEQ ID NO. 14 **(2B8)**, resíduos 20-131 de SEQ ID NO. 24 **(2F8)**, resíduos 23-129 de SEQ ID NO. 34 **(3B6)**, resíduos 23-128 de SEQ ID NO. 44 **(3D11)**, resíduos 21-127 de SEQ ID NO. 54 **(1D3)**, resíduos 21-127 de SEQ ID NO. 64 **(1F3)**, e resíduos 21-127 de SEQ ID NO. 74 **(3A12)**.

[00050] Em outra modalidade, a proteína de ligação compreende uma região variável de cadeia pesada de imunoglobulina que compreende a sequência de aminoácidos dos resíduos 20-141 de SEQ ID NO: 2 **(1A3)** e uma região variável da cadeia leve de imunoglobulina que compreende a sequência de aminoácidos dos resíduos 21-127 de SEQ ID NO: 4 **(1A3)**.

[00051] Em uma modalidade, a proteína de ligação compreende uma região variável da cadeia pesada de imunoglobulina que compreende a sequência de aminoácidos dos resíduos 20-137 de SEQ ID NO: 12 **(2B8)** e uma região variável da cadeia leve de imunoglobulina que compreende a sequência de aminoácidos dos resíduos 21-127 de SEQ ID NO: 4 **(2B8)**.

[00052] Em outra modalidade, a proteína de ligação compreende uma região variável da cadeia pesada de imunoglobulina que compreende a sequência de aminoácidos dos resíduos 20-137 de SEQ ID NO: 22 **(2F8)** e uma região variável de cadeia leve de imunoglobulina que compreende a sequência de aminoácidos dos resíduos 20-131 de SEQ ID NO: 24 **(2F8)**.

[00053] Em outra modalidade, a proteína de ligação compreende uma região variável da cadeia pesada de imunoglobulina que compreende a sequência de aminoácidos dos resíduos 20-139 de SEQ ID NO: 32 **(3B6)** e uma região variável de cadeia leve de imunoglobulina que compreende a sequência de aminoácidos dos

resíduos 23-129 de SEQ ID NO: 34 **(3B6)**.

[00054] Em outra modalidade, a proteína de ligação compreende uma região variável da cadeia pesada de imunoglobulina que compreende a sequência de aminoácidos dos resíduos 20-132 de SEQ ID NO: 42 **(3D11)** e uma região variável da cadeia leve de imunoglobulina que compreende a sequência de aminoácidos dos resíduos 23-128 de SEQ ID NO: 44 **(3D11)**.

[00055] Em outra modalidade, a proteína de ligação compreende uma região variável da cadeia pesada de imunoglobulina que compreende a sequência de aminoácidos dos resíduos 20-141 de SEQ ID NO: 52 **(1D3)** e uma região variável da cadeia leve de imunoglobulina que compreende a sequência de aminoácidos dos resíduos 21-127 de SEQ ID NO: 54 **(1D3)**.

[00056] Em outra modalidade, a proteína de ligação compreende uma região variável de cadeia pesada de imunoglobulina que compreende a sequência de aminoácidos dos resíduos 20-141 de SEQ ID NO: 62 **(1F3)** e uma região variável da cadeia leve de imunoglobulina que compreende a sequência de aminoácidos dos resíduos 21-127 de SEQ ID NO: 64 **(1F3)**.

[00057] Em outra modalidade, a proteína de ligação compreende uma região variável da cadeia pesada de imunoglobulina que compreende a sequência de aminoácidos dos resíduos 20-141 de SEQ ID NO: 72 **(3A12)** e uma região variável da cadeia leve de imunoglobulina que compreende a sequência de aminoácidos dos resíduos 21-127 de SEQ ID NO: 74 **(3A12)**.

[00058] Em qualquer uma das modalidades anteriores, a proteína de ligação pode ser um anticorpo intacto, um fragmento deste que se liga a antígeno ou um sítio de anticorpo biossintético.

[00059] Em outro aspecto, a invenção fornece uma proteína de ligação isolada que se liga a HGF humano. A proteína de ligação

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

[00060] Em outro aspecto, a invenção fornece uma proteína de ligação isolada que se liga a HGF humano. A proteína de ligação compreende (i) uma cadeia leve de imunoglobulina selecionada do grupo que consiste em SEQ ID NO. 177 (**Hu2B8 Kv1-39.1 + constante capa (alótipo Km(3) (alelo 2))**), SEQ ID NO. 181 (**Hu2B8 Kv3-15.1 + constante Capa (alótipo Km(3) (alelo 2))**), SEQ ID NO. 197 (**LR2B8LC + constante Capa (alótipo Km(3) (alelo 1))**), e SEQ ID NO. 201 (**LRMR2B8LC + constante Capa (alótipo Km(3) (alelo 1))**); e (ii) uma imunoglobulina da cadeia pesada selecionada do grupo que consiste em SEQ ID NO. 163 (**Hu2B8 Hv1f.1 + constante de IgG1 (alótipo G1m(17,1))**), SEQ ID NO. 167 (**Hu2B8 Hv5a.1 + constante de IgG1 (alótipo G1m(17,1))**), SEQ ID NO. 171 (**Hu2B8 Hv5-51.1 + Constante de IgG1 (alótipo G1m(17,1))**), SEQ ID NO. 187 (**LR2B8HC + constante de IgG1 (alótipo G1m(3)) (alelo 1)**), e SEQ ID NO. 191 (**LRMR2B8HC + constante de IgG1 (alótipo G1m(3))**)

**(alelo 1)).** A proteína de ligação pode ser um anticorpo intacto, um fragmento de ligação ao antígeno deste ou um sítio de anticorpo biossintético.

[00061] Em outro aspecto, a invenção fornece uma proteína de ligação isolada que se liga a HGF humano reduzido. A proteína de ligação compreende (i) uma região variável da cadeia leve de imunoglobulina que compreende três CDRs e (ii) uma região variável da cadeia pesada de imunoglobulina que compreende três CDRs. As CDRs estão tipicamente interpostas entre FRs. As CDRs da cadeia leve de imunoglobulina e da cadeia pesada de imunoglobulina juntas definem um sítio de ligação que se liga a HGF humano reduzido, por exemplo, a cadeia  $\alpha$  de HGF reduzido. HGF reduzido se refere a HGF tratado com uma quantidade de agente redutor, por exemplo, ditioneitol (DTT), 2-mercaptoetanol ou glutathione suficiente para reduzir a ligação dissulfeto entre a cadeia  $\alpha$  e a cadeia  $\beta$ . Concentrações exemplares incluem, por exemplo, DTT 100 mM e 2-mercaptoetanol 5%.

[00062] Em certas modalidades, a proteína de ligação compreende uma região variável de cadeia leve de imunoglobulina que compreende pelo menos uma CDR selecionada do grupo que consiste em CDR<sub>L1</sub>, CDR<sub>L2</sub> e CDR<sub>L3</sub>. Opcionalmente, a proteína de ligação compreende duas CDRs, por exemplo, CDR<sub>L1</sub> e CDR<sub>L2</sub>, ou CDR<sub>L1</sub> e CDR<sub>L3</sub>, ou CDR<sub>L1</sub> e CDR<sub>L3</sub>. Opcionalmente, a proteína de ligação compreende todas as três CDRs, isto é, CDR<sub>L1</sub>, CDR<sub>L2</sub> e CDR<sub>L3</sub>. CDR<sub>L1</sub> compreende a sequência de aminoácidos X<sub>1</sub> X<sub>2</sub> Ser X<sub>4</sub> X<sub>5</sub> X<sub>6</sub> X<sub>7</sub> X<sub>8</sub> X<sub>9</sub> X<sub>10</sub> X<sub>11</sub> X<sub>12</sub> X<sub>13</sub> X<sub>14</sub> X<sub>15</sub>, em que o aminoácido X<sub>1</sub> é Arg ou Lys, X<sub>2</sub> é Ala ou Thr, X<sub>4</sub> é Glu ou Gln, X<sub>5</sub> é Asn, Ser, ou Asp, X<sub>6</sub> é Ile ou Val, X<sub>7</sub> é Tyr, Asp, ou Lys, X<sub>8</sub> é uma ligação peptídica ou Tyr, X<sub>9</sub> é uma ligação peptídica ou Asp, X<sub>10</sub> é uma ligação peptídica ou Gly, X<sub>11</sub> é uma ligação peptídica ou Asn, X<sub>12</sub> é uma ligação peptídica ou Ser, X<sub>13</sub>

é Asn ou Tyr, X<sub>14</sub> é Ile ou Leu, X<sub>15</sub> é Ala, Asn, ou Ser. CDR<sub>L2</sub> compreende a sequência de aminoácidos X<sub>16</sub> X<sub>17</sub> X<sub>18</sub> X<sub>19</sub> Leu X<sub>21</sub> X<sub>22</sub>, em que o aminoácido X<sub>16</sub> é Ala, Asp, Val, ou Arg, X<sub>17</sub> é Ala ou Val, X<sub>18</sub> é Asn, Ser, ou Thr, X<sub>19</sub> é Arg, Asn, ou He, X<sub>21</sub> é Ala, Glu, Val, ou Pro, X<sub>22</sub> é Asp ou Ser. CDR<sub>L3</sub> compreende a sequência de aminoácidos X<sub>23</sub> X<sub>24</sub> X<sub>25</sub> X<sub>26</sub> X<sub>27</sub> X<sub>28</sub> Pro X<sub>30</sub> Thr, em que o aminoácido X<sub>23</sub> é Leu ou Gln, X<sub>24</sub> é H ou Gln, X<sub>25</sub> é Phe, Ser, ou Tyr, X<sub>26</sub> é Asp, Ile, ou Trp, X<sub>27</sub> é Gly ou Glu, X<sub>28</sub> é Asp, Phe, ou Thr, X<sub>30</sub> é Phe, Pro, ou Tyr.

[00063] Em outra modalidade, a proteína de ligação compreende uma região variável de cadeia leve de imunoglobulina que compreende pelo menos uma CDR selecionada do grupo que consiste em CDR<sub>H1</sub>, CDR<sub>H2</sub>, e CDR<sub>H3</sub>. Opcionalmente, a proteína de ligação compreende duas CDRs, por exemplo, CDR<sub>H1</sub> e CDR<sub>H2</sub>, ou CDR<sub>H1</sub> e CDR<sub>H3</sub>, ou CDR<sub>H1</sub> e CDR<sub>H3</sub>. Opcionalmente, a proteína de ligação compreende todas as três CDRs, isto é, CDR<sub>H1</sub>, CDR<sub>H2</sub> e CDR<sub>H3</sub>. CDR<sub>H1</sub> compreende a sequência de aminoácidos X<sub>1</sub> Tyr X<sub>3</sub> X<sub>4</sub> X<sub>5</sub>, em que o aminoácido X<sub>1</sub> é Asp, Asn, Ser, ou Thr, X<sub>3</sub> é Phe, Trp, ou Tyr, X<sub>4</sub> é Ile ou Met, X<sub>5</sub> é Asn, Hé, ou Ser. CDR<sub>H2</sub> compreende a sequência de aminoácidos X<sub>6</sub> Ile X<sub>8</sub> X<sub>9</sub> Gly X<sub>11</sub> Gly X<sub>13</sub> X<sub>14</sub> X<sub>15</sub> Tyr X<sub>17</sub> X<sub>18</sub> X<sub>19</sub> X<sub>20</sub> Lys X<sub>22</sub>, em que o aminoácido X<sub>6</sub> é Lys, Gln, ou Tyr, X<sub>8</sub> é Gly, Ser, ou Tyr, X<sub>9</sub> é Pro ou Ser, X<sub>11</sub> é Asp, Gly, ou Ser, X<sub>13</sub> é Asp ou Ser, X<sub>14</sub> é Ser ou Thr, X<sub>15</sub> é Asn ou Tyr, X<sub>17</sub> é Asn ou Pro, X<sub>18</sub> é Ala, Asp, Gly, ou Glu, X<sub>19</sub> é Asn, Met, ou Ser, X<sub>20</sub> é Phe ou Val, X<sub>22</sub> é Asp ou Gly. CDR<sub>H3</sub> compreende a sequência de aminoácidos X<sub>23</sub> X<sub>24</sub> X<sub>25</sub> X<sub>26</sub> X<sub>27</sub> X<sub>28</sub> X<sub>29</sub> X<sub>30</sub> X<sub>31</sub> X<sub>32</sub> X<sub>33</sub> Asp Tyr, em que o aminoácido X<sub>23</sub> é Arg ou Gln, X<sub>24</sub> é Gly ou Leu, X<sub>25</sub> é Asp, Gly, ou uma ligação peptídica, X<sub>26</sub> é Gly ou uma ligação peptídica, X<sub>27</sub> é uma ligação peptídica ou Tyr, X<sub>28</sub> é Leu, uma ligação peptídica ou Tyr, X<sub>29</sub> é a Gly, Arg ou Leu, X<sub>30</sub> é Asp, Gly ou Glu, X<sub>31</sub> é a Tyr, Arg ou Asn, X<sub>32</sub> é Ala, Gly ou Tyr, X<sub>33</sub> é Met ou Phe.



[00064] Compreende-se que a proteína de ligação pode compreender ambas as sequências de cadeia leve de imunoglobulina e cadeia pesada de imunoglobulina ou fragmentos dessas, registrados acima. Além disso, é compreendido que a proteína de ligação pode ser um anticorpo intacto ou um fragmento deste que se liga a antígeno ou um sítio de anticorpo biossintético.

[00065] Em certas modalidades, a proteína de ligação compreende uma região variável da cadeia leve de imunoglobulina que compreende (i) uma CDR<sub>L1</sub> que tem uma sequência selecionada do grupo que consiste em SEQ ID NO. 8 (**1A3**), SEQ ID NO. 28 (**2F8**), SEQ ID NO. 38 (**3B6**), SEQ ID NO. 58 (**1D3**), e SEQ ID NO. 68 (**1F3**), (ii) uma CDR<sub>L2</sub> que tem uma sequência selecionada do grupo que consiste em SEQ ID NO. 9 (**1A3**), SEQ ID NO. 29 (**2F8**), SEQ ID NO. 39 (**3B6**), SEQ ID NO. 59 (**1D3**), e SEQ ID NO. 69 (**1F3**), e (iii) uma CDR<sub>L3</sub> que tem uma sequência selecionada do grupo que consiste em SEQ ID NO. 10 (**1A3**), SEQ ID NO. 30 (**2F8**), SEQ ID NO. 40 (**3B6**), SEQ ID NO. 60 (**1D3**), e SEQ ID NO. 70 (**1F3**). As sequências de CDR podem ser interpostas entre FRs humanas ou humanizadas.

[00066] Em outras modalidades, a proteína de ligação compreende uma região variável da cadeia leve de imunoglobulina que compreende uma sequência de aminoácidos selecionada do grupo que consiste nos resíduos 21-127 de SEQ ID NO. 4 (**1A3**), resíduos 20-131 de SEQ ID NO. 24 (**2F8**), resíduos 23-129 de SEQ ID NO. 34 (**3B6**), resíduos 21-127 de SEQ ID NO. 54 (**1D3**), e resíduos 21-127 de SEQ ID NO. 64 (**1F3**).

[00067] Em certas outras modalidades, a proteína de ligação compreende uma região variável de cadeia pesada de imunoglobulina que compreende (i) uma CDR<sub>H1</sub> que tem uma sequência selecionada do grupo que consiste em SEQ ID NO. 5 (**1A3**), SEQ ID NO. 25 (**2F8**), SEQ ID NO. 35 (**3B6**), SEQ ID NO. 55 (**1D3**), e SEQ ID NO. 65 (**1F3**),

(ii) uma CDR<sub>H2</sub> que tem uma sequência selecionada do grupo que consiste em SEQ ID NO. 6 **(1A3)**, SEQ ID NO. 26 **(2F8)**, SEQ ID NO. 36 **(3B6)**, SEQ ID NO. 56 **(1D3)**, e SEQ ID NO. 66 **(1F3)**, e (iii) uma CDR<sub>H3</sub> que tem uma sequência selecionada do grupo que consiste em SEQ ID NO. 7 **(1A3)**, SEQ ID NO. 27 **(2F8)**, SEQ ID NO. 37 **(3B6)**, SEQ ID NO. 57 **(1D3)**, e SEQ ID NO. 67 **(1F3)**. As sequências de CDR podem ser interpostas entre FRs humanas ou humanizadas.

[00068] Em outra modalidade, a região variável da cadeia pesada de imunoglobulina compreende uma sequência de aminoácidos selecionada do grupo que consiste nos resíduos 20-141 de SEQ ID NO. 2 **(1A3)**, resíduos 20-137 de SEQ ID NO. 22 **(2F8)**, resíduos 20-139 de SEQ ID NO. 32 **(3B6)**, resíduos 20-141 de SEQ ID NO. 52 **(1D3)**, e resíduos 20-141 de SEQ ID NO. 62 **(1F3)**.

[00069] Em outro aspecto, a invenção fornece uma proteína de ligação isolada que se liga a HGF humano e compreende uma região variável de cadeia leve de imunoglobulina e uma região variável de cadeia pesada de imunoglobulina. A proteína de ligação isolada compete pela ligação a HGF com pelo menos um anticorpo de referência selecionado do grupo que consiste em (i) um anticorpo que tem uma região variável de cadeia leve de imunoglobulina com resíduos 20-131 de SEQ ID NO. 24 **(2F8)** e uma região variável de cadeia pesada de imunoglobulina com resíduos 20-137 de SEQ ID NO. 22 **(2F8)**, (ii) um anticorpo que tem uma região variável de cadeia leve de imunoglobulina com resíduos 23-129 de SEQ ID NO. 34 **(3B6)**, e uma região variável de cadeia pesada de imunoglobulina com resíduos 20-139 de SEQ ID NO. 32 **(3B6)** e (iii) um anticorpo que tem uma região variável de cadeia leve de imunoglobulina com resíduos 23-128 de SEQ ID NO. 44 **(3D11)** e uma região variável de cadeia pesada de imunoglobulina com resíduos 20-132 de SEQ ID NO. 42 **(3D11)**. Sob certas circunstâncias, a proteína de ligação se liga ao

mesmo epítipo de HGF como um dos anticorpos de referência.

[00070] É compreendido que cada uma das proteínas de ligação discutidas acima pode ser um anticorpo intacto, por exemplo, um anticorpo monoclonal. Alternativamente, a proteína de ligação pode ser um fragmento de um anticorpo que se liga a antígeno ou pode ser um sítio de ligação de anticorpo biossintético. Fragmentos de anticorpo incluem fragmentos Fab, Fab', (Fab')<sub>2</sub> ou Fv. Técnicas para fazer tais fragmentos de anticorpo são conhecidas por aqueles versados na técnica. Vários sítios de ligação de anticorpo biossintético são conhecidos na técnica, por exemplo, moléculas de Fv único ou sFv, descritas, por exemplo, na Patente US 5.476.786. Outros sítios de ligação de anticorpo biossintético incluem proteínas de ligação biespecíficas ou bifuncionais que são anticorpos ou fragmentos de anticorpo que se ligam a pelo menos dois antígenos diferentes. Por exemplo, proteínas de ligação biespecíficas podem se ligar a HGF, por exemplo, HGF humano e outro antígeno de interesse. Métodos para fazer anticorpos biespecíficos são conhecidos na técnica e incluem, por exemplo, a fusão de hibridomas ou ligação de fragmentos Fab'. Veja, por exemplo, Songsivilai *et al.* (1990) CLIN. EXP. IMMUNOL. 79: 315-325; Kostelny *et al.* (1992) J. IMMUNOL. 148: 1547-1553.

[00071] As proteínas de ligação da invenção podem se ligar a hHGF que contém uma substituição de cisteína por arginina na posição 561 ou uma substituição de glicina por glutamato na posição 555.

[00072] Em outro aspecto, a invenção fornece uma proteína de ligação isolada que se liga a HGF humano com uma  $k_d$  de  $4,0 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$  ou menor,  $3,0 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$  ou menor, ou  $2,0 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$  ou menor. As proteínas de ligação isoladas podem se ligar a HGF humano com  $k_d$  de  $5,0 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$  a  $0,5 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$ , ou de  $4,0 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$  a  $1,0 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$ , ou de  $3,0 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$  a  $1,5 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$ . Em outro aspecto, a invenção fornece uma

proteína de ligação isolada que se liga a HGF humano com  $K_D$  de 100 pM ou menor, ou 20 pM ou menor, ou 10 pM ou menor ou 5 pM ou menor. As proteínas de ligação isoladas podem se ligar a HGF humano com  $K_D$  de 100 pM a 5 pM, ou de 20 pM a 5 pM, ou de 15 pM a 10 pM, ou de 20 pM a 10 pM, ou de 15 pM a 5 pM. A menos que especificado de outra maneira, valores de  $K_D$  são determinados pelos métodos e sob as condições descritas no Exemplo 6.

[00073] Em outro aspecto, a invenção fornece uma proteína de ligação isolada que se liga a HGF humano, em que o anticorpo se liga a HGF humano com  $K_D$  menor a 37°C do que a 25°C. A proteína de ligação opcionalmente se liga a HGF humano com  $K_D$  menor do que 5 pM a 37°C.

[00074] Em outros aspectos e modalidades, as proteínas de ligação podem inibir a ligação de hHGF a c-Met. Por exemplo, as proteínas de ligação podem ter uma  $IC_{50}$  (concentração a 50% da inibição máxima) de pelo menos cerca de 4,0, 4,5, 5,0, 5,5, 6,0, 6,5, e 7,0 nM quando testadas usando o protocolo descrito no Exemplo 7(a). Em certas outras modalidades, as proteínas de ligação podem neutralizar a incorporação de BrdU mediada por HGF em células 4 MBr-5 (ATCC, N° de catálogo CCL208) usando o método descrito no Exemplo 7(b).

[00075] As proteínas de ligação podem ter uma  $IC_{50}$  de 50 nM ou menor, preferivelmente 45, 40, 35, 30, 25, 20, 15, 10, 5, 1, 0.5 nM ou menor, quando ensaiadas usando o protocolo descrito no Exemplo 7(b). Em certas outras modalidades, as proteínas de ligação podem ser usadas para inibir a fosforilação de c-Met estimulada por HGF em células PC-3 (ATCC, Manassus, VA N° de catálogo. CRL-1435) usando o ensaio descrito no Exemplo 9.

## II – Produção de Proteínas de Ligação

[00076] Proteínas de ligação da invenção podem ser produzidas de várias maneiras usando abordagens conhecidas na técnica. Por

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

[00077] Os ácidos nucléicos que codificam as proteínas de ligação desejadas podem ser introduzidos (ligados) em vetores de expressão, que podem ser introduzidos em uma célula hospedeira através de técnicas usuais de transfecção ou de transformação conhecidas na técnica. Células hospedeiras exemplares incluem, por exemplo, células de *E. coli*, células de ovário de hamster chinês (CHO), células de rim de filhote de hamster (BHK), células de rim de macaco (COS), células de carcinoma hepatocelular humano (por exemplo, Hep G2) e células de mieloma que não produzem proteína imunoglobulina de outra maneira. Células hospedeiras transfectadas podem ser cultivadas sob condições que permitem as células hospedeiras expressar os genes de interesse, por exemplo, os genes que codificam as regiões variáveis de cadeia leve e pesada de imunoglobulina. Os

produtos de expressão resultantes podem ser coletados usando técnicas conhecidas.

[00078] As condições de expressão e purificação particulares variarão dependendo de qual sistema de expressão é empregado. Por exemplo, se o gene for expresso em *E. coli*, ele é clonado primeiro em um vetor de expressão. Isso é obtido pelo posicionamento do gene manipulado a jusante do promotor bacteriano adequado, por exemplo, Trp ou Tac, e uma sequência de sinal, por exemplo, uma sequência que codifica um fragmento B da proteína A (FB). A proteína de fusão expressa resultante se acumula tipicamente em corpos refrativos ou de inclusão no citoplasma das células e podem ser coletadas após a ruptura das células por prensa francesa ou sonicação. Os corpos refrativos são então solubilizados e as proteínas expressas reenoveladas e clivadas por métodos já estabelecidos para muitas outras proteínas recombinantes.

[00079] Se o gene manipulado for expresso em células hospedeiras eucarióticas, por exemplo, células de mieloma ou células CHO, ele é inserido primeiro em um vetor de expressão que contém um promotor eucariótico adequado, um sinal de secreção, intensificadores de imunoglobulina e vários íntrons. Esse vetor de expressão pode conter opcionalmente sequências que codificam toda ou uma parte de uma região constante, possibilitando que uma cadeia pesada ou leve inteira ou uma parte seja expressa. O construto de gene pode ser transfectado em células de mieloma ou células CHO usando protocolos de transfecção estabelecidos. Tais células transfectadas podem expressar fragmentos de  $V_L$  ou  $V_H$ , heterodímeros de  $V_L$ - $V_H$ , polipeptídeos de cadeia simples de  $V_H$ - $V_L$  ou  $V_L$ - $V_H$ , cadeias pesadas ou leves completas de imunoglobulina ou porções desses, cada um dos quais podendo ser acoplados a um domínio de proteína que tem outra função (por exemplo, citotoxicidade).

### III – Modificações das Proteínas de Ligação

[00080] É compreendido que as proteínas de ligação podem ser modificadas para otimizar o desempenho dependendo do uso pretendido das proteínas de ligação. Por exemplo, a proteína de ligação está sendo usada como um agente terapêutico, a proteína de ligação pode ser modificada para reduzir sua imunogenicidade no receptor pretendido. Alternativamente ou, adicionalmente, a proteína de ligação pode ser fundida ou acoplada à outra proteína ou peptídeo, por exemplo, um fator de crescimento, citocina ou citotoxina. Tais modificações podem ser obtidas usando técnicas de manipulação de gene de rotina conhecidas na técnica.

[00081] Várias técnicas para reduzir a antigenicidade de anticorpos ou fragmentos de anticorpo são conhecidas na técnica. Essas técnicas podem ser usadas para reduzir ou eliminar a antigenicidade das proteínas de ligação da invenção. Por exemplo, quando as proteínas de ligação são para ser administradas a um ser humano, as proteínas de ligação são preferivelmente manipuladas para reduzir sua antigenicidade em seres humanos. Esse processo é geralmente referido como humanização. Preferivelmente, as proteínas de ligação humanizadas têm a mesma ou substancialmente a mesma afinidade pelo antígeno que a proteína de ligação não humanizada original da qual ela é derivada.

[00082] Em uma abordagem de humanização bem conhecida, proteínas quiméricas são criadas nas quais as regiões constantes de imunoglobulina de anticorpos de uma espécie, por exemplo, camundongo, são substituídas por regiões constantes de imunoglobulina de uma segunda espécie diferente, por exemplo, um humano. Nesse exemplo, o anticorpo resultante é uma quimera de camundongo-humano, onde as sequências da região constante humana, em princípio, são menos imunogênicas do que as sequências

de murino correspondentes. Esse tipo de manipulação de anticorpo é descrito, por exemplo, em Morrison, *et al.* (1984) PROC. NAT. ACAD. SCI. 81: 6851-6855, Neuberger *et al.* (1984) NATURE 312: 604-608; Patente US 6.893.625 (Robinson); 5.500.362 (Robinson); e 4.816.567 (Cabilly).

[00083] Em outra abordagem, conhecida como enxerto de CDR, as CDRs das regiões variáveis de cadeia leve e pesada de um anticorpo de interesse são enxertadas em regiões de arcabouço (FRs) de outra espécie. Por exemplo, CDRs de murino podem ser enxertadas em sequências de FR humanas. Em algumas modalidades, as CDRs das regiões variáveis de cadeia leve e pesada de um anticorpo anti-HGF são enxertadas em FRs humanas ou FRs humanas de consenso. A fim de criar FRs humanas de consenso, FRs de várias sequências de aminoácidos de cadeia pesada ou cadeia leve humanas são alinhadas para identificar a sequência de aminoácidos de consenso. O enxerto de CDR está descrito, por exemplo, em Patente US 7.022.500 (Queen); 6.982.321 (Winter); 6.180.370 (Queen); 6.054.297 (Carter); 5.693.762 (Queen); 5.859.205 (Adair); 5.693.761 (Queen); 5.565.332 (Hoogenboom); 5.585.089 (Queen); 5.530.101 (Queen); Jones *et al.* (1986) NATURE 321: 522-525; Riechmann *et al.* (1988) NATURE 332: 323-327; Verhoeyen *et al.* (1988) SCIENCE 239: 1534-1536; e Winter (1998) FEBS LETT 430: 92-94.

[00084] Em uma abordagem chamada "super-humanização", anticorpos nos quais a imunogenicidade humana está reduzida ou eliminada são criados por uma forma alternativa de enxerto. Na super-humanização, sequências de FR são escolhidas de um grupo de genes de linhagem germinativa humana com base na similaridade estrutural das CDRs humanas com aquelas do anticorpo de camundongo a ser humanizado. Essa abordagem é descrita, por exemplo, na Patente US 6.881.557 (Foote) e em Tan *et al.* (2002) J.



IMMUNOL 169:1119-1125.

[00085] Outras abordagens para reduzir a imunogenicidade incluem técnicas que são conhecidas como "transformação", "hiperquimerização" ou "recapeamento/revestimento" para produzir anticorpos humanizados. Veja, por exemplo, Vaswami *et al.* (1998) ANNALS OF ALLERGY, ASTHMA, & IMMUNOL. 81: 105; Roguska *et al.* (1996) PROT. ENGINEER 9: 895-904; e Patente US 6.072.035 (Hardman). Na abordagem de recapeamento/revestimento, os resíduos de aminoácidos de superfície acessível no anticorpo de murino são substituídos por resíduos de aminoácidos mais frequentemente encontrados nas mesmas posições em um anticorpo humano. Esse tipo de revestimento de anticorpo está descrito, por exemplo, na Patente US 5.639.641 (Pedersen).

[00086] Uma abordagem exemplar para conversão de um anticorpo de camundongo em uma forma adequada para uso médico em seres humanos é conhecida como tecnologia ACTIVMAB<sup>®</sup> (Vaccinex, Inc., Rochester, NY), que envolve um vetor baseado no vírus da vacínia para expressar anticorpos em células de mamífero. Altos níveis de diversidade combinatória das cadeias pesadas e leves de imunoglobulina são ditos serem produzidos. Veja, por exemplo, Patente US 6.706.477 (Zauderer); US 6.800.442 (Zauderer); e US 6.872.518 (Zauderer).

[00087] Outra abordagem exemplar para conversão de um anticorpo de camundongo em uma forma adequada para uso em seres humanos é a tecnologia praticada comercialmente por KaloBios Pharmaceuticals, Inc. (Palo Alto, CA). Essa tecnologia envolve o uso de uma biblioteca "acceptora" de propriedade humana para produzir uma biblioteca "focalizada no epítipo" para seleção de anticorpo.

[00088] Outra abordagem exemplar para modificação de um anticorpo de camundongo em uma forma adequada para uso médico

em humanos é a tecnologia HUMAN ENGINEERING® (HE®), que é praticada comercialmente por XOMA (US) LLC. Veja, por exemplo, Pedido de Publicação Internacional N° WO 93/11794 e Patente US 5.766.886; US 5.770.196; US 5.821.123; e US 5.869.619.

[00089] Qualquer abordagem adequada, incluindo qualquer uma das abordagens acima, pode ser utilizada para reduzir ou eliminar a imunogenicidade humana de uma proteína de ligação de interesse.

[00090] Além disso, é possível criar anticorpos totalmente humanos em camundongos. Nessa abordagem, anticorpos humanos são preparados usando um camundongo transgênico no qual os genes que produzem anticorpo de camundongo foram substituídos por uma porção substancial de genes que produzem anticorpo humano. Tais camundongos produzem imunoglobulina humana ao invés de moléculas de imunoglobulina de murino. Veja, por exemplo, WO 98/24893 (Jacobovitz et al.) e Mendez *et al.* (1997) NATURE GENETICS 15: 146-156. Anticorpos monoclonais anti-HGF totalmente humanos podem ser produzidos usando a seguinte abordagem. Camundongos transgênicos que contêm genes de imunoglobulina humana são imunizados com o antígeno de interesse, por exemplo, HGF. Células linfáticas dos camundongos são então obtidas dos camundongos, que são então fundidas com uma linhagem celular de tipo mielóide para preparar linhagens celulares de hibridoma imortalizado. As linhagens celulares de hibridoma são rastreadas e selecionadas para identificar linhagens celulares de hibridoma que produzem anticorpos específicos para HGF.

[00091] Proteínas de ligação da invenção podem ser conjugadas com outras moléculas, dependendo do uso pretendido. Por exemplo, se a proteína de ligação for usada como um terapêutico, então a proteína de ligação pode ser conjugada com outro agente, por exemplo, uma molécula efetora que modula ou, promove a terapia de

outra forma. À medida que o efector é um agente baseado em uma não proteína, por exemplo, um fármaco de molécula pequena, um radiomarcador ou toxina, então o agente pode ser quimicamente acoplado usando químicas de acoplamento *in vitro* padronizadas. Se, por outro lado, a molécula efectora é uma proteína ou peptídeo, por exemplo, uma enzima, receptor, toxina, fator de crescimento, citocina ou outro imunomodulador, então a proteína de ligação pode ser quimicamente acoplada ao efector usando químicas de acoplamento *in vitro* ou podem ser acopladas ao efector como uma proteína de fusão. Proteínas de fusão podem ser construídas e expressas usando técnicas similares àquelas discutidas na seção II.

#### IV – Uso de Proteínas de Ligação

[00092] As proteínas de ligação descritas aqui podem ser usadas como um agente de diagnóstico ou um agente terapêutico.

##### (1) Aplicações Terapêuticas

[00093] Como as proteínas de ligação da invenção neutralizam a atividade de HGF, elas podem ser usadas em várias aplicações terapêuticas. Por exemplo, certas proteínas de ligação da invenção são úteis na prevenção ou tratamento de doenças ou desordens hiperproliferativas, por exemplo, várias formas de câncer.

[00094] As proteínas de ligação podem ser usadas para inibir ou reduzir a proliferação de células tumorais. Em tal abordagem, as células tumorais são expostas a uma quantidade terapêuticamente eficaz da proteína de ligação a fim de inibir ou reduzir a proliferação da célula tumoral. Em certas modalidades, as proteínas de ligação inibem a proliferação de célula tumoral em pelo menos 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95% ou 100%.

[00095] Em certas modalidades, a proteína de ligação é usada para inibir ou reduzir a proliferação de uma célula de tumor, na qual a proteína de ligação reduz a habilidade de hHGF de se ligar a c-Met.

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

[00096] Além disso, a proteína de ligação pode ser usada para inibir ou reduzir o crescimento ou desenvolvimento do tumor em um mamífero. Em tal método, uma quantidade eficaz de proteína de ligação é administrada ao mamífero a fim de inibir ou reduzir o crescimento do tumor em um mamífero. Conseqüentemente, as proteínas de ligação podem ser usadas para tratar tumores, por exemplo, em um mamífero. O método compreende administrar uma quantidade terapeuticamente eficaz da proteína de ligação. A proteína de ligação pode ser administrada sozinha ou em combinação com outra molécula farmacologicamente ativa a fim de tratar o tumor.

[00097] Considera-se que as proteínas de ligação da invenção podem ser usadas no tratamento de uma variedade de distúrbios responsivos a HGF, incluindo, por exemplo, células tumorais responsivas a HGF no câncer de pulmão, câncer de mama, câncer de colo, câncer de próstata, câncer ovariano, câncer de cabeça e pescoço, câncer ovariano, mieloma múltiplo, câncer de fígado, câncer gástrico, câncer de esôfago, câncer de rim, câncer de nasofaringe, câncer pancreático, mesotelioma, melanoma e glioblastoma.

[00098] Conforme usado aqui "tratar", "tratando" e "tratamento" referem-se ao tratamento de um estado de doença em um mamífero, particularmente em um ser humano, e incluem: (a) impedir que o estado de doença ocorra em um mamífero, em particular quando tal mamífero está predisposto ao estado de doença, mas ainda não foi diagnosticado como o tendo; (b) inibir o estado de doença, isto é, parar seu desenvolvimento; e/ou (c) aliviar o estado de doença, isto é,

causar a regressão do estado de doença.

[00099] Geralmente, uma quantidade terapeuticamente eficaz do componente ativo estará na faixa entre cerca de 0,1 mg/kg a cerca de 100 mg/kg, opcionalmente de cerca de 1 mg/kg a cerca de 100 mg/kg, opcionalmente de cerca de 1 mg/kg a cerca de 10 mg/kg. A quantidade administrada dependerá de variáveis tais como o tipo e extensão da doença ou indicação a ser tratada, do estado de saúde do paciente em particular, da eficácia biológica relativa da proteína de ligação liberada, da formulação da proteína de ligação, da presença e dos tipos de excipientes na formulação e da via de administração. A dosagem inicial administrada pode ser aumentada além do nível superior a fim de se obter rapidamente o nível sanguíneo ou nível tecidual desejados ou a dosagem inicial pode ser menor do que o ótimo e a dosagem diária pode ser progressivamente aumentada durante o curso do tratamento dependendo da situação particular. A dosagem humana pode ser otimizada, por exemplo, em um estudo de intensificação de dosagem convencional de Fase I planejado para correr entre 0,5 mg/kg a 20 mg/kg. A frequência de dosagem pode variar, dependendo de fatores tais como a via de administração, quantidade dosada e a condição da doença a ser tratada. Frequências de dosagem exemplares são uma vez por dia, uma vez por semana e uma vez a cada duas semanas. A via de administração preferida é parenteral, por exemplo, infusão intravenosa. A formulação de fármacos baseados em anticorpos monoclonais está dentro da técnica comum. Em algumas modalidades da invenção, a proteína de ligação, por exemplo, um anticorpo monoclonal, é liofilizada e reconstituída em salina tamponada no momento da administração.

[000100] As proteínas de ligação podem ser administradas tanto sozinhas quanto em combinação com outros ingredientes farmacologicamente ativos. Os outros ingredientes ativos, por exemplo,

imunomoduladores, podem ser administrados junto com a proteína de ligação ou podem ser administrados antes ou depois da proteína de ligação.

[000101] Formulações contendo as proteínas de ligação para uso terapêutico, incluem tipicamente as proteínas de ligação combinadas com um veículo farmacologicamente aceitável. Conforme usado aqui, "veículo farmacologicamente aceitável" significa tampões, veículos e excipientes que são, dentro do escopo do julgamento clínico, adequados para uso em contato com tecidos de seres humanos e animais sem toxicidade excessiva, irritação, resposta alérgica ou outro problema ou complicação, correspondente a uma proporção benefício/risco razoável. O(s) veículo(s) deve(m) ser "aceitável(eis)" no sentido de serem compatíveis com outros ingredientes das formulações e não deletérios para o receptor. Veículos farmacologicamente aceitáveis, nesse aspecto, pretendem incluir qualquer um e todos os tampões, solventes, meios de dispersão, revestimentos, agentes isotônicos e prolongadores da absorção e semelhantes, compatíveis com administração farmacêutica. O uso de tais meios e agentes para substâncias farmacologicamente ativas é conhecido na técnica.

[000102] As formulações podem ser convenientemente apresentadas em uma forma de dosagem unitária e podem ser preparadas por qualquer método adequado, incluindo quaisquer métodos bem conhecidos na técnica da farmácia. Uma composição farmacêutica da invenção deve ser formulada para ser compatível com sua via de administração pretendida. Exemplos de vias de administração incluem administração parenteral ou administração não parenteral, por exemplo, intravenosa, intradérmica, inalação, transdérmica (tópica), transmucosa e administração retal. Soluções úteis para administração oral ou parenteral podem ser preparadas por qualquer um dos

métodos bem conhecidos na técnica farmacêutica, descritos, por exemplo, em *Remington's Pharmaceutical Sciences*, 18ª d. (Mack Publishing Company, 1990).

[000103] Formulações adequadas para administração oral podem estar na forma de: unidades individuais tais como injeções, cápsulas, cápsulas gelatinosas, sachês, comprimidos, pastilhas ou drágeas, cada uma contendo uma quantidade predeterminada da proteína de ligação; uma composição em pó ou granulada; uma solução ou uma suspensão em um líquido aquoso ou um líquido não aquoso; ou uma emulsão de óleo em água ou uma emulsão de água em óleo.

[000104] Formulações adequadas para administração parenteral incluem, por exemplo, os seguintes componentes: um diluente estéril tal como água para injeção, solução salina, óleos fixos, polietileno glicóis, glicerina, propileno glicol ou outros solventes sintéticos; agentes antibacterianos tais como álcool benzílico ou metil parabenos; antioxidantes tais como ácido ascórbico ou bissulfeto de sódio; agentes quelantes tais como ácido etilenodiaminotetraacético; tampões tais como acetatos, citratos ou fosfatos e agentes para o ajuste da tonicidade tais como ácido clorídrico ou hidróxido de sódio. A preparação parenteral pode ser acondicionada em ampolas, seringas descartáveis ou frascos de doses múltiplas feitos de vidro ou plástico.

[000105] Em geral, composições adequadas para uso injetável incluem soluções aquosas (quando solúveis em água) ou dispersões e pós para preparação extemporânea de soluções injetáveis estéreis ou dispersão. Para administração intravenosa, veículos adequados incluem salina fisiológica, água bacteriostática, Cremophor ELTM (BASF, Parsippany, NJ) ou salina tamponada com fosfato (PBS). Ela deve ser estável sob as condições de produção e armazenamento e deve ser preservada contra a ação contaminante de microorganismos tais como bactérias e fungos. O veículo pode ser um solvente ou um

meio de dispersão que contém, por exemplo, água, etanol, poliol (por exemplo, glicerol, propileno glicol e polietileno glicol líquido) e misturas adequadas desses.

[000106] As formulações farmacêuticas preferivelmente são estéreis, A esterilização pode ser obtida, por exemplo, por filtração através de membranas de filtração estéreis. Onde as composições são liofilizadas, a esterilização usando esse método pode ser conduzida antes ou após a liofilização e reconstituição. Uma vez que a composição farmacêutica tenha sido formulada, ela pode ser armazenada, por exemplo, em frascos como uma solução, suspensão, gel, emulsão, sólido ou como um pó desidratado ou liofilizado.

## (2) Aplicações Diagnósticas

[000107] Sempre que as proteínas de ligação forem usadas com propósitos de diagnóstico, tanto *in vitro* quanto *in vivo*, as proteínas de ligação são marcadas tanto diretamente quanto indiretamente com uma porção detectável. A porção detectável pode ser qualquer porção que é capaz de produzir, tanto diretamente quanto indiretamente, um sinal detectável. Por exemplo, a porção detectável pode ser um radioisótopo, tal como <sup>3</sup>Hidrogênio (<sup>3</sup>H), <sup>14</sup>Carbono (<sup>14</sup>C), <sup>32</sup>Fósforo (<sup>32</sup>P), <sup>35</sup>Enxofre (<sup>35</sup>S), ou <sup>125</sup>Iodo (<sup>125</sup>I); um composto fluorescente ou quimioluminescente, tal como isotiocianato de fluoresceína, rodamina ou luciferina; uma enzima, tal como fosfatase alcalina, beta-galactosidase ou peroxidase de rábano silvestre; uma sonda paramagnética, tal como um marcador de spin; ou uma partícula colorida, por exemplo, uma partícula de látex ou ouro. É compreendido que a proteína de ligação pode ser conjugada com a porção detectável usando várias abordagens conhecidas na técnica, por exemplo, como descrito em Hunter *et al.* (1962) NATURE 144: 945; David *et al.* (1974) BIOCHEMISTRY 13: 1014; Pain *et al.* (1981) J. IMMUNOL. METH. 40: 219; and Nygren (1982) J. HISTOCHEM. AND CYTOCHEM. 30: 407. Os



marcadores podem ser detectados, por exemplo, visualmente ou com a ajuda de um espectrofotômetro ou outro detector.

[000108] As proteínas de ligação podem ser empregadas em uma ampla faixa de técnicas de imunoensaio disponíveis na técnica. Imunoensaios exemplares incluem, por exemplo, imunoensaios sanduíche, imunoensaios competitivos e procedimentos imuno-histoquímicos.

[000109] Em um imunoensaio intercalado, dois anticorpos que se ligam a um analito ou antígeno de interesse são usados, por exemplo, um imobilizado sobre um suporte sólido e um livre em solução e marcado com uma porção detectável. Quando uma amostra que contém o antígeno é introduzida nesse sistema, o antígeno se liga ao anticorpo imobilizado e ao anticorpo marcado, para formar uma "intercalação" de complexo imune sobre a superfície do suporte. A proteína complexada é detectada pela lavagem dos componentes não ligados da amostra e do excesso de anticorpo marcado e pela medida de anticorpo marcado complexado à proteína sobre a superfície do suporte. Alternativamente, o anticorpo livre em solução pode ser detectado por um terceiro anticorpo marcado com uma porção detectável que se liga ao anticorpo livre. Uma revisão detalhada do planejamento de ensaio imunológico, teoria e protocolos podem ser encontrados em vários textos, incluindo Butt, ed., (1984) PRACTICAL IMMUNOLOGY, Marcel Dekker, New York; Harlow *et al.* eds. (1988) ANTIBODIES, A LABORATORY APPROACH, Cold Spring Harbor Laboratory; and Diamandis *et al.*, eds. (1996) IMMUNOASSAY, Academic Press, Boston.

[000110] É considerado que as proteínas de ligação marcadas são úteis como agentes de imagem *in vivo*, através do que as proteínas de ligação podem direcionar os agentes de imagem para os tecidos particulares de interesse do receptor. Uma porção remotamente

detectável preferida para imagem *in vivo* inclui o átomo radioativo Tecnécio<sup>99m</sup> (<sup>99m</sup>Tc), um emissor gama com uma meia-vida de cerca de seis horas. Porções não radioativas também úteis em imagem *in vivo* incluem marcadores de spin de nitróxido assim como lantanídeo e íons de metal de transição, todos os quais induzem atenuação de próton *in situ*. Além de imunotomografia, as porções radioativas complexadas podem ser usadas em protocolos padronizados de rádio-imunoterapia para destruir as células-alvo. Nucleotídeos preferidos para radioimunoterapia em altas doses incluem os átomos radioativos <sup>90</sup>Ítrio (<sup>90</sup>Yt), <sup>131</sup>Iodo (<sup>131</sup>I) e <sup>111</sup>Índio (<sup>111</sup>In). A proteína de ligação pode ser marcada com <sup>131</sup>I, <sup>111</sup>In e <sup>99m</sup>Tc usando técnicas de acoplamento conhecidas nas técnicas de imagem. Similarmente, procedimentos para preparar e administrar o agente de imagem assim como capturar e processar imagens são bem conhecidas na técnica de imagem e, portanto, não são discutidos em detalhes nesse. Similarmente, métodos para realizar imunoterapias baseadas em anticorpo são bem conhecidas na técnica. Veja, por exemplo, Patente US 5.543.254.

[000111] Ao longo de toda a descrição, onde as composições são descritas como tendo, incluindo ou compreendendo componentes específicos, é contemplado que as composições também consistem essencialmente, ou consistem nos componentes listados. Similarmente, onde os processos são descritos como tendo, incluindo ou compreendendo etapas específicas do processo, os processos também consistem essencialmente ou consistem nas etapas de processamento listadas. Exceto onde indicado de outra maneira, a ordem das etapas ou ordem de realização de certas ações são irrelevantes com a condição de que a invenção permaneça operativa. Além disso, a menos que observado de outra maneira, duas ou mais etapas ou ações podem ser conduzidas simultaneamente.

## EXEMPLOS

[000112] Os seguintes exemplos discutem a produção e caracterização e vários anticorpos monoclonais anti-hHGF.

#### Exemplo 1 – Produção de Anticorpos Monoclonais Anti-hHGF

[000113] Este Exemplo descreve a produção de vários anticorpos monoclonais anti-hHGF.

[000114] As imunizações, fusões e rastreamentos primários foram conduzidos em MBS Inc. (Portland, ME), após o protocolo de Múltiplos Locais de Imunização Repetitiva (Repetitive Immunization Multiple Sites (RIMMS)). Cinco camundongos AJ e cinco camundongos Balb/c foram imunizados com HGF humano recombinante (R&D Systems, Minneapolis, MN; Nº de catálogo 294-HGN-025). Dois camundongos com soros apresentando as maiores atividades anti-HGF por Ensaio Imunoabsorvente Ligado a Enzima (ELISA) foram escolhidos para fusão subsequente. Os baços e nodos linfáticos dos camundongos apropriados foram coletados. As células B foram então colhidas e fundidas com uma linhagem de mieloma. Os produtos de fusão foram diluídos seriadamente em uma ou mais placas até próximo da clonalidade. Os sobrenadantes das fusões resultantes foram examinados quanto a sua ligação a hHGF por ELISA. Os sobrenadantes identificados como contendo anticorpos para HGF foram caracterizados posteriormente por um teste funcional *in vitro* discutido nos exemplos seguintes. Um painel de hibridomas foi selecionado e os hibridomas foram subclonados e expandidos. Os anticorpos monoclonais foram então purificados por cromatografia de afinidade sobre resina de Proteína A/G sob condições usuais.

#### Exemplo 2 – Análise de Sequência de Anticorpos Monoclonais anti-hHGF

[000115] Este exemplo descreve as análises de isótipo e sequência dos anticorpos monoclonais anti-hHGF produzidos no Exemplo 1.

##### a. Determinação dos Isótipos dos Anticorpos Monoclonais Murinos de

## HGF

[000116] O tipo de cadeia leve e o isótipo de cadeia pesada de cada anticorpo monoclonal foram determinados usando o kit IsoStrip Mouse Monoclonal Antibody Isotyping de acordo com as instruções do fabricante (Roche Applied Science).

[000117] Foi determinado que todos os anticorpos continham uma cadeia leve capa de imunoglobulina e uma cadeia pesada de imunoglobulina de IgG1.

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

[000118] O RNA total foi extraído de cada linhagem celular de hibridoma monoclonal usando o kit RNeasy Miniprep de acordo com as instruções do fabricante (Qiagen Venlo, Holanda). A primeira fita de cDNA de extensão completa foi gerada usando o kit de amplificação de cDNA BD SMART<sup>®</sup> RACE de acordo com as instruções do fabricante (Clontech) usando os iniciadores de oligonucleotídeo BD SMART II A (5' aagcagtggatcaacgcagagtagcgagg 3') (SEQ ID NO. 85) e o iniciador 5'-RACE CDS (5' tttttttttttttttt tttttvn 3', onde v = a, g, ou c e n = a, g, c, ou t) (SEQ ID NO. 86) com a finalidade de 5' RACE (Rápida Amplificação das Extremidades do cDNA).

[000119] As regiões variáveis das cadeias de imunoglobulina Pesada (IgG1) e Capa foram amplificadas por PCR (Reação em Cadeia da Polimerase) usando o Sistema Expand High-Fidelity PCR System (Roche Applied Science) de acordo com as instruções do fabricante. As regiões variáveis de cadeia pesada foram amplificadas com a mistura de iniciadores de oligonucleotídeo 5' Universal Primer Mix A (mistura de 5' ctaatacgactcactatagggca agcagtggatcaacgcagagt 3' (SEQ ID NO. 87) e 5' ctaatacgactcactatagggc 3' (SEQ ID NO. 88)) e um 3' iniciador específico para a região constante de IgG1, ou 5' tatgcaaggcttacaaccaca 3' (SEQ ID NO. 89) ou 5' gccagtggataga

cagatgggggtgtcg 3' (SEQ ID NO. 90). As regiões variáveis de cadeia Capa foram amplificadas com a mistura de iniciador de oligonucleotídeo 5' Universal Primer Mix A e um iniciador específico para a Região Constante Capa 3', ou 5' ctcattcctgttgaagctcttgacaat 3' (SEQ ID NO. 91) ou 5' cgactgaggcacctccagatgtt 3' (SEQ ID NO. 92).

[000120] Os produtos de PCR individuais foram fracionados por eletroforese em gel de agarose e purificados usando o kit Qiaquick Gel Purification de acordo com as instruções do fabricante (Qiagen). Os produtos de PCR foram subsequentemente clonados no plasmídeo pCR2.1 TOPO usando o kit de clonagem baseado em topoisomerase TOPO TA Cloning® Kit (com o vetor pCR®2.1-TOPO®) de acordo com as instruções do fabricante (Invitrogen, Carlsbad, CA) e transformados em bactérias DH5 usando técnicas de transformação usuais. O DNA de plasmídeo isolado dos clones bacterianos transformados foi sequenciado usando os iniciadores de T7 (5' TAATACG ACTCACTATAGGG 3') (SEQ ID NO. 93), de M13 de sentido direto (5' GTA AAACGACGGCCAGT 3') (SEQ ID NO. 94), e de M13 de sentido reverso (5' CAGGAAACAGCTATGACC 3') (SEQ ID NO. 95) por Agencourt Bioscience usando métodos de sequenciamento de didesoxi DNA usuais para identificar a sequência das sequências da região variável. As sequências foram analisadas usando o programa Vector NTI (Invitrogen, Carlsbad, CA) e o servidor da internet IMG/Quest (<http://imgt.cines.fr/textes/vquest>) para identificar e confirmar as sequências da região variável.

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

[000121] cDNAs de extensão completa para as cadeias de IgG1 de 1A3, 1D3, e 1F3 foram amplificados por PCR a partir do cDNA criado

acima usando o seguinte iniciador de sentido direto 5' ggggacaagtttgtacaaaaaag caggctgccaccatgaactttgggctcagattgattttcc 3' (códon de início sublinhado) (SEQ ID NO. 96) e o iniciador de sentido reverso 5' ggggaccactttgtacaagaa agctggggtcatttaccaggagagtgggagagg 3' (códon de parada sublinhado) (SEQ ID NO. 97). cDNA de extensão completa para a cadeia de IgG1 de 2B8 foi amplificada a partir do cDNA criado acima usando o seguinte iniciador de sentido direto 5' ggggacaagtttgtacaaaaaagcaggctgccaccatggggatggagctatatc atcctcttt 3' (códon de início sublinhado) (SEQ ID NO. 98) e iniciador de sentido reverso 5' ggggaccactttgtacaagaaagctggggtcatttaccaggagagtgggagag 3' (códon de parada sublinhado) (SEQ ID NO. 99).

[000122] cDNA de extensão completa para a cadeia Capa de 2B8 foi amplificado usando o seguinte iniciador de sentido direto 5' ggggacaagtttgtaca aaaaagcaggctgccaccatggaatcacagactctggtcttcata 3' (códon de início sublinhado) (SEQ ID NO. 100) e o iniciador de sentido reverso 5' ggggaccactttg tacaagaaagctgggtctaacactcattcctgttgaagctc 3' (códon de parada sublinhado) (SEQ ID NO. 101). Os fragmentos de PCR foram subclonados em pDONR221 (Invitrogen, Carlsbad, CA) por reação de recombinação Gateway BP (Invitrogen, Carlsbad, CA) e sequenciados por Agencourt Bioscience usando métodos de sequenciamento de didesoxi DNA usuais para identificar a sequência da região constante e confirmar adicionalmente as sequências da região variável.

#### d. Análise de sequência

[000123] As regiões variáveis (texto normal) foram identificadas usando o servidor da internet IMGT/V-QUEST (<http://imgt.cines.fr/textes/vquest/>). As sequências de Peptídeo de Sinal foram previstas com base na identificação do códon de início *in frame* (ATG) que estava à montante da Região Variável identificada. As sequências de peptídeo de sinal foram identificadas e estão

sublinhadas abaixo.

[000124] O último nucleotídeo de cada região variável é a primeira base do próximo códon gerado pela junção da região variável/constante. Este nucleotídeo está incluído na região variável porque ele é parte deste éxon. As sequências de aminoácido das regiões constantes listadas abaixo incluem a tradução deste códon de junção.

[000125] A fim de criar as sequências do anticorpo da cadeia pesada ou capa completas, as sequências da região variável observadas abaixo são combinadas com suas respectivas sequências da região constante (as sequências de sinal estão sublinhadas).

**(1) Região Variável da Cadeia Pesada de 1A3 (SEQ ID NO. 1)**

```

1  atgaactttg  ggctcagatt  gattttcctt  gtccttgttt
   taaaaggtgt gaagtgtgaa
61  gtgcagctgg  tggagtctgg  gggaggctta  gtgcagcctg
   gaggggccct  gaaactctcc
121 tgtgcagcct  ctgaattcac  tttcagtaac  tattacatgt
   cttgggttcg  ccagactcca
181 gagaagaggc  tgcagtgggt  cgcatacatt  agtcctgggtg
   gtggtagctc  ctactatcca
241 gccagtgtga  agggtcgatt  caccatctcc  agagacaatg
   ccaagaacac  cctgtacctg
301 caaatgagca  gtctgaagtc  tgaggacaca  gccatgtatt
   actgtgcaag  acaaggggat
361 ggttactacg  gggactatgc  tatggactac  tgggggtcaag
   gaacctcagt  caccgtctcc
421 tcag

```

**(2) Região Variável da Cadeia Leve Capa de 1A3 (SEQ ID NO. 3)**

```

1  atgagtgtgc  ccactcaggt  cctggggttg  ctgctgctgt
   ggcttacaga tgccagatgt
61  gacatccaga  tgactcagtc  tccagcctcc  ctatctgttt

```

ctgtgggaga aactgtcacc  
 121 atcacatgtc gagcaagtga gaatatttat agtaatttag  
 catggtatca gcagaaacag  
 181 ggaaaatctc ctcagctcct ggtctatgct gcaacaaact  
 tagcagatgg tgtgccatca  
 241 aggttcagtg gcagtggatc aggcacacag ttttcctca  
 agatcaacag cctgcagtct  
 301 gaagattttg ggacttatta ctgtcaacat ttttggggta  
 ctccgtacac gttcggaggg  
 361 gggaccaagc tggaaataaa ac

**(3) Região Variável da Cadeia Pesada de 2B8 (SEQ ID NO. 11)**

1 atgggatgga gctatatcat cctctttttg gtagcaacag  
ctacagatgt cactcccag  
 61 gtccaactgc agcagcctgg ggctgaactg gtgaagcctg  
 ggacttcagt gaagctgtcc  
 121 tgcaaggctt ctggctacac cttcaccacc tactggatgc  
 actgggtgaa tcagaggcct  
 181 ggacaaggcc ttgagtggat tggagagatt aatcctacca  
 acggtcatac taactacaat  
 241 gagaagttca agagcaaggc cactgact gtagacaaat  
 cctccagcac agcctacatg  
 301 caactcagca gcctgacatc tgaggactct gcggtctatt  
 actgtgcaag aactatggt  
 361 ggtagcatct ttgactactg gggccaaggc accactctca  
 cagtctcctc ag

**(4) Região Variável da Cadeia Leve Capa de 2B8 (SEQ ID NO. 13)**

1 atggaatcac agactctggg cttcatatcc atactgctct  
ggttatatgg tgctgatggg  
 61 aacattgtaa tgaccaatc tcccaaatcc atgtccatgt  
 cagtaggaga gagggtcacc  
 121 ttgagctgca aggccagtga gaatgtgggt tcttatgtat



cctggtatca acagaaacca  
 181 gcgcagtctc ctaaactgct gatatacggg gcatccaacc  
 ggaacactgg ggtccccgat  
 241 cgcttcacag gcagtggatc tgcaacagat ttcactctga  
 ccatcagcag tgtgcgggct  
 301 gaagaccttg cagattatca ctgtgggcag agttacaact  
 atccgtacac gttcggaggg  
 361 gggaccaggc tggaaataaa ac

**(5) Região Variável da Cadeia Pesada de 2F8 (SEQ ID NO. 21)**

1 atggaatgga gctgggtctt tctcttctc ctgtcagtaa  
ctgcaggtgt cactgccag  
 61 gtccagctga agcagtctgg agctgagctg gtgaggcctg  
 ggacttcagt gaagatgtcc  
 121 tgcaaggctt ctggctacac cttcactacc tactatatac  
 actgggtgaa tcagaggcct  
 181 ggacagggcc ttgagtggat tggaaagatt ggtcctggaa  
 gtggtagtac ttactacaat  
 241 gagatgttca aagacaaggc cacattgact gtagacacat  
 cctccagcac agcctacatg  
 301 cagctcagca gcctgacatc tgacgactct gcggtctatt  
 tctgtgcaag aaggggactg  
 361 ggacgtggct ttgactactg gggccaaggc accactctca  
 cagtctctc ag

**(6) Região Variável da Cadeia Leve Capa de 2F8 (SEQ ID NO. 23)**

1 atggagacag acacaatcct gctatgggtg ctgctgctct  
gggttccagg ctccactggg  
 61 gacattgtgc tgaccaatc tccagcttct ttggctgtgt  
 ctctagggca gagggccacc  
 121 atctcctgca aggccagcca aagtgttgat tatgatggta  
 atagttatat caactgggtac  
 181 caacagaaac caggacagcc acccaaagtc ctcatctatg

ttgcatccaa tctagaatct  
 241 gggatcccag ccaggtttag tggcagtggg tctgggacag  
 acttcaccct caacatccat  
 301 cctgtggagg aggaggatgc tgcaacctat tactgtcagc  
 aaagtattga ggatecctccc  
 361 acgttcgggtg ctgggaccaa gctggagctg aaac

**(7) Região Variável da Cadeia Pesada de 3B6 (SEQ ID NO. 31)**

1 atggaatggc cttgtatctt tctcttcctc ctgtcagtaa  
ctgaaggtgt ccaactcccag  
 61 gttcagctgc agcagtctgg ggctgaactg gtgaggcctg  
 ggtcctcagt gaagatttcc  
 121 tgcaaggctt ctggctatgt attcagtagc tactggatga  
 actgggtgaa gcagaggcct  
 181 ggacagggtc ttgagtggat tggacagatt tatecctggag  
 atggtgatag taactacaat  
 241 ggaaacttca agggtaaagc cacactgact gcagacaaat  
 cctccagtac agcctacatg  
 301 cagctcagca gcctaacatc tgaggactct gcggtctatt  
 tctgtgcatc ccagctcggg  
 361 ctacgtgaga actactttga ctactggggc caaggcacca  
 ctctcacagt ctctcag

**(8) Região Variável da Cadeia Leve Capa de 3B6 (2 possíveis códons de início ATG (letras maiúsculas)) (SEQ ID NO. 33)**

1 ATGgacATGa ggaccctgc tcagtttctt ggaatcttgt  
tgctctgggt tccaggtatc  
 61 aatgtgaca tcaagatgac ccagtctcca tcttccatgt  
 atgcatctct aggagagaga  
 121 gtcacaatca cttgcaaggc gagtcaggac attaaaagct  
 atttaagctg gttccagcag  
 181 aaaccagga aatctcctaa gaccctgatc tatcgtgtaa  
 acagattggt agatggggtc

241 ccatcaaggt tcagtgccag tggatctggg caagattctt  
 ctctcacat caccagcctg  
 301 gagaatgaag atatgggaat ttattattgt ctacagtatg  
 atgagtttcc gttcacgttc  
 361 ggagggggga ccaagctgga aataaagc

**(9) 3D11 Região Variável da Cadeia Pesada (SEQ ID NO. 41)**

1 atggctgtcc cggtgctggt cctctgcctg gttgcatttc  
caagctgtgt cctgtcccag  
 61 gtacagctga aggagtcagg acctggcctg gtggcgccct  
 cacagagcct gtccatcact  
 121 tgcactgtct ctgggttttc attaaccagc tatagtttac  
 actgggttcg ccagcctcca  
 181 ggaaagggtc tggaatggct gggagtaata tgggctgggtg  
 gaaacacaaa ttataattcg  
 241 tctctcatgt ccagactgac catcaggaaa gacaactcca  
 agagccaagt tttcttaaaa  
 301 atgaacagtc tgcaaactga tgacacagcc atgtactact  
 gtgccagaga gaggtttgct  
 361 tactggggcc aagggactct ggtcactgtc tctgcag

**(10) Região Variável da Cadeia Leve Capa de 3D11 (SEQ ID NO. 43)**

1 atggattttc aagtgcagat tttcagcttc ctgctaataca  
gtgcctcagt caaatatcc  
 61 agaggacaaa ttgttctcac ccagtctcca gcaatcatgt  
 ctgcatatcc aggggagaag  
 121 gtcacatga cctgcagtgc cagctcaagt gtaagttaca  
 tgcactggta ccagcagaag  
 181 tcaggcacct ccccaaaaag atggatttat gacacatcca  
 aactggcttc tggagtcctt  
 241 gctcgcttca gtggcagtgg gtctgggacc tcttactccc  
 tcacaatcag tagtatggag  
 301 gctgaagatg ctgccactta ttactgccag cagtggagta

gtaaccact cacgttcggt

361 gctgggacca agctggagct gaaac

**(11) Região Variável da Cadeia Pesada de 1D3 (SEQ ID NO. 51)**

1 atgaactttg ggctcagatt gattttcctt gtccttgttt

taaaaggtgt gaagtgtgaa

61 gtgcagctgg tggagtctgg gggaggctta gtgcagcctg

gagggtcctt gaaactctcc

121 tgtgcagcct ctggattcac tttcagtgac tattacatgt

cttgggttcg ccagactcca

181 gagaagaggc tggagtgggt cgcatacatt agtagtgggtg

gtggtagcac ctactatcca

241 gacagtgtga agggtcgatt caccatctcc cgagacaatg

ccaagaacac cctgtacctg

301 caaatgagca gtctgaagtc tgaggacaca gccatatatt

actgtgtgag acaaggggat

361 ggttattacg gggactatgc tatggactac tgggggtcaag

gaacctcagt catcgtctcc

421 tcag

**(12) Região Variável da Cadeia Leve Capa de 1D3 (SEQ ID NO. 53)**

1 atgagtgtgc cactcaggt cctgggggtg ctgctgctgt

ggcttacaga tgtcagatgt

61 gacatccaga tgactcagtc tccagcctcc ctatctgtat

ctgtgggaga aactgtcacc

121 atcacatgtc gaacaagtga gaatatttac agtaatttag

cgtgggtatca gcagaaacag

181 ggaaaatctc ctcagctcct aatctatgct gcaacaaact

tagcagatgg tgtgccatca

241 aggttcagtg gcagtggatc aggcacacag ttttcctca

ggatcaacag cctgcagtct

301 gaagattttg ggaggtatta ctgtcaacat ttttggggga

ctccgtacac gttcggaggg

361 gggaccaaac tggaaataaa ac

**(13) Região Variável da Cadeia Pesada de 1F3 (SEQ ID NO. 61)**

1 atgaactttg ggctcagatt gattttcctt gtccttgttt  
taaaaggtgt gaagtgtgag  
61 gtgcagctgg tggagtctgg gggaggctta gtgcagtctg  
gagggtcctt gaaactctcc  
121 tgtgcggcct ctggattcac tttcagtaac tatttcatgt  
cttgggttcg ccagactcca  
181 gagaagaggc tggagtgggt cgcatatatt agtagtgggtg  
gtggtagcac ctactatcca  
241 gacagtgtga agggtcgatt caccatctct agagacaatg  
ccaagaacac cctgtacctg  
301 caaatgagca gtctgaagtc tgaggacaca gccatgtatt  
actgtgtaag acaaggggat  
361 ggttactacg gggactatgc tatggactac tgggggtcaag  
gaacctcagt caccgtctcc  
421 tcag

**(14) Região Variável da Cadeia Leve Capa de 1F3 (SEQ ID NO. 63)**

1 atgagtgtgc cactcaggt cctggggttg ctgctgctgt  
ggcttacaga tgccagatgt  
61 gacatccaga tgactcagtc tccagcctcc ctatctgtat  
ctgtgggaga aactgtcacc  
121 atcacatgtc gagcaagtga gaatatttac agtaatttag  
catggtatca gcagaaacag  
181 ggaaaatctc ctcagctcct ggtctatgat gcaacacact  
taccagatgg tgtgcatca  
241 aggttcagtg gcagtggatc aggcacacag ttttccctca  
agatcaacag cctgcagtct  
301 gaagatthttg ggagttatta ctgtcaacat ttttggggta  
ctccgtacac gtttggaggg  
361 gggaccagac tggaaattaa ac

**(15) Região Variável da Cadeia Pesada de 3A12 (SEQ ID NO. 71)**

1 atgaactttg ggctcagatt gattttcctt gtccttgttt  
taaaaggtgt gaagtgtgaa  
 61 gtgcagctgg tggagtctgg gggaggctta gtgcagcctg  
 gaggggccct gaaaatctcc  
 121 tgtgcagcct ctggatttac tttcagtaac tatttcatgt  
 cttggggttcg ccagactcca  
 181 gagaagaggc tggagtgggt cgcatacatt agtagtgggtg  
 gtggtagcac ctactatcca  
 241 gacagtgtga agggctcgatt caccatctcc agagacaatg  
 ccaagaacac cctgtacctg  
 301 caaatgaaca gtctgaagtc tgaggacaca gccatgtatt  
 actgtgtaag acaaggagat  
 361 ggttactatg gggactatgc tatggactac tgggggtcaag  
 gaacctcagt caccgtctcc  
 421 tcag

**(16) Região Variável da Cadeia Leve Capa de 3A12 (SEQ ID NO. 73)**

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

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

```

1  ccaaaacgac  acccccatct  gtctatccac  tggcccctgg
atctgctgcc  caaactaact

61  ccatggtgac  cctgggatgc  ctggtcaagg  gctatttccc
tgagccagtg  acagtgacct

121 ggaactctgg  atccctgtcc  agcgggtgtgc  acaccttccc
agctgtcctg  gagtctgacc

181 tctacactct  gagcagctca  gtgactgtcc  cctccagccc
tcggcccagc  gagaccgtca

241 cctgcaacgt  tgcccacccg  gccagcagca  ccaaggtgga
caagaaaatt  gtgcccaggg

301 attgtggttg  taagccttgc  atatgtacag  tcccagaagt
atcatctgtc  ttcattttcc

361 ccccaaagcc  caaggatgtg  ctcaccatta  ctctgactcc
taaggtcacg  tgtgttgtgg

421 tagacatcag  caaggatgat  cccgaggtcc  agttcagctg
gtttgtagat  gatgtggagg

481 tgcacacagc  tcagacgcaa  ccccgggagg  agcagttcaa
cagcactttc  cgctcagtca

541 gtgaacttcc  catcatgcac  caggactggc  tcaatggcaa
ggagttcaaa  tgcaggggtca

601 acagtgcagc  tttccctgcc  cccatcgaga  aaaccatctc
caaaaccaa  ggcagaccga

661 aggctccaca  ggtgtacacc  attccacctc  ccaaggagca
gatggccaag  gataaagtca

721 gtctgacctg  catgataaca  gacttcttcc  ctgaagacat
tactgtggag  tggcagtgga

781 atgggcagcc  agcggagaac  tacaagaaca  ctcagcccat
catgaacacg  aatggctctt

841 acttcgtcta  cagcaagctc  aatgtgcaga  agagcaactg

```

ggaggcagga aatactttca  
 901 cctgctctgt gttacatgag ggcctgcaca accaccatac  
 tgagaagagc ctctcccact  
 961 ctcttggtaa atga

**(18) Região Constante da Cadeia Pesada de IgG1 de Camundongo  
 Determinada para 1A3, 1D3, 1F3, e 2B8 (derivada de camundongo da  
 cepa AJ) (SEQ ID NO. 82)**

1 ccaaaacgac acccccatct gtctatccac tggcccctgg  
 atctgctgcc caaactaact  
 61 ccatggtgac cctgggatgc ctggtcaagg gctatttccc  
 tgagccagtg acagtgacct  
 121 ggaactctgg atccctgtcc agcgggtgtgc acaccttccc  
 agctgtcctg cagtctgacc  
 181 tctacactct gagcagctca gtgactgtcc cctccagcac  
 ctggcccagc gagaccgtca  
 241 cctgcaacgt tgcccaccog gccagcagca ccaaggtgga  
 caagaaaatt gtgcccaggg  
 301 attgtggttg taagccttgc atatgtacag tcccagaagt  
 atcatctgtc ttcattttcc  
 361 ccccaaagcc caaggatgtg ctcaccatta ctctgactcc  
 taaggtcacg tgtgttgtgg  
 421 tagacatcag caaggatgat cccgaggtcc agttcagctg  
 gttttagat gatgtggagg  
 481 tgcacacagc tcagacgcaa ccccgggagg agcagttcaa  
 cagcactttc cgctcagtca  
 541 gtgaacttcc catcatgcac caggactggc tcaatggcaa  
 ggagttcaaa tgcaggggtca  
 601 acagtgcagc tttccctgcc cccatcgaga aaaccatctc  
 caaaaccaa ggcagaccga  
 661 aggctccaca ggtgtacacc attccacctc ccaaggagca  
 gatggccaag gataaagtca



721 gtctgacctg catgataaca gacttcttcc ctgaagacat  
 tactgtggag tggcagtgga  
 781 atgggcagcc agcggagaac tacaagaaca ctcagcccat  
 catggacaca gatggctctt  
 841 acttcgtcta cagcaagctc aatgtgcaga agagcaactg  
 ggaggcagga aatactttca  
 901 cctgctctgt gttacatgag ggctgcaca accaccatac  
 tgagaagagc ctctcccact  
 961 ctcttggtaa atga

**(19) Região Constante da Cadeia Leve Capa de Camundongo de Referência (V00807) e Região Constante da Cadeia Leve Capa de Camundongo Determinada para 1D3, 1F3, e 2B8 (derivada de camundongo da cepa AJ) (SEQ ID NO. 83)**

1 gggctgatgc tgcaccaact gtatccatct tcccaccatc  
 cagtgagcag ttaacatctg  
 61 gaggtgcctc agtcgtgtgc ttcttgaaca acttctaccc  
 caaagacatc aatgtcaagt  
 121 ggaagattga tggcagtgaa cgacaaaatg gcgtcctgaa  
 cagttggact gatcaggaca  
 181 gcaaagacag cacctacagc atgagcagca ccctcacgtt  
 gaccaaggac gagtatgaac  
 241 gacataacag ctatacctgt gaggccactc acaagacatc  
 aacttcaccc attgtcaaga  
 301 gcttcaacag gaatgagtgt tag

**(20) Região Constante da Cadeia Leve Capa de Camundongo Determinada para 1A3 contendo um nucleotídeo alterado em comparação com 1D3, 1F3, e 2B8 (sublinhados) (SEQ ID NO. 84)**

1 gggctgatgc tgcaccaact gtatccatct tcccaccatc  
 cagtgagcag ttaacatctg  
 61 gaggtgcctc agtcgtgtgc ttcttgaaca acttctaccc  
 caaagacatc aatgtcaagt

```

121 ggaagattga   tggcagtgaa   cgacaaaatg   gcgtcctgaa
cagttggact gatcaggaca
181 gcaaagacag   cacctacagc   atgagcagca   ccctcatggt
gaccaaggac gagtatgaac
241 gacataacag   ctatacctgt   gaggccactc   acaagacatc
aacttcaccc attgtcaaga
301 gcttcaacag   gaatgagtgt   tag

```

[000126] Cada uma das sequências de aminoácido que define as regiões variáveis da cadeia pesada de imunoglobulina para os anticorpos produzidos no Exemplo 1 é descrita na Figura 2. Cada uma das sequências é alinhada com as outras e as sequências que definem o peptídeo de sinal, CDR<sub>1</sub>, CDR<sub>2</sub> e CDR<sub>3</sub> são identificadas por quadrados. A Figura 3 mostra um alinhamento das sequências de CDR<sub>1</sub>, CDR<sub>2</sub> e CDR<sub>3</sub> separadas para cada um dos anticorpos.

[000127] Cada uma das sequências de aminoácido que define as regiões variáveis da cadeia leve de imunoglobulina para cada um dos anticorpos produzidos no Exemplo 1 é descrita na Figura 4. Cada uma das sequências é alinhada com as outras e as sequências que definem o peptídeo de sinal, CDR<sub>1</sub>, CDR<sub>2</sub> e CDR<sub>3</sub> são identificadas por quadrados. A Figura 5 mostra um alinhamento das sequências de CDR<sub>1</sub>, CDR<sub>2</sub> e CDR<sub>3</sub> separadas para cada um dos anticorpos.

[000128] Por conveniência, a Tabela 1 fornece um quadro de concordância que mostra a correspondência entre as sequências de anticorpo discutidas neste Exemplo com aquelas apresentadas na Listagem de Sequência.

**TABELA 1**

SEQ. ID NO.	Proteína ou Ácido Nucléico
1	Região Variável da Cadeia Pesada de 1A3 – ácido nucléico
2	Região Variável da Cadeia Pesada de 1A3 – proteína
3	Região Variável da Cadeia Leve (capa) de 1A3 – ácido nucléico
4	Região Variável da Cadeia Leve (capa) de 1A3 – proteína
5	CDR <sub>1</sub> da Cadeia Pesada de 1A3
6	CDR <sub>2</sub> da Cadeia Pesada de 1A3

SEQ. ID NO.	Proteína ou Ácido Nucléico
7	CDR <sub>3</sub> da Cadeia Pesada de 1A3
8	CDR <sub>1</sub> da Cadeia Leve (capa) de 1A3
9	CDR <sub>2</sub> da Cadeia Leve (capa) de 1A3
10	CDR <sub>3</sub> da Cadeia Leve (capa) de 1A3
11	Região Variável da Cadeia Pesada de 2B8 – ácido nucléico
12	Região Variável da Cadeia Pesada de 2B8 – proteína
13	Região Variável da Cadeia Leve (capa) de 2B8 – ácido nucléico
14	Região Variável da Cadeia Leve (capa) de 2B8 – proteína
15	CDR <sub>1</sub> da Cadeia Pesada de 2B8
16	CDR <sub>2</sub> da Cadeia Pesada de 2B8
17	CDR <sub>3</sub> da Cadeia Pesada de 2B8
18	CDR <sub>1</sub> da Cadeia Leve (capa) de 2B8
19	CDR <sub>2</sub> da Cadeia Leve (capa) de 2B8
20	CDR <sub>3</sub> da Cadeia Leve (capa) de 2B8
21	Região Variável da Cadeia Pesada de 2F8 – ácido nucléico
22	Região Variável da Cadeia Pesada de 2F8 – proteína
23	Região Variável da Cadeia Leve (capa) de 2F8 – ácido nucléico
24	Região Variável da Cadeia Leve (capa) de 2F8 – proteína
25	CDR <sub>1</sub> da Cadeia Pesada de 2F8
26	CDR <sub>2</sub> da Cadeia Pesada de 2F8
27	CDR <sub>3</sub> da Cadeia Pesada de 2F8
28	CDR <sub>1</sub> da Cadeia Leve (capa) de 2F8
29	CDR <sub>2</sub> da Cadeia Leve (capa) de 2F8
30	CDR <sub>3</sub> da Cadeia Leve (capa) de 2F8
31	Região Variável da Cadeia Pesada de 3B6 – ácido nucléico
32	Região Variável da Cadeia Pesada de 3B6 – proteína
33	Região Variável da Cadeia Leve (capa) de 3B6 – ácido nucléico
34	Região Variável da Cadeia Leve (capa) de 3B6 – proteína
35	CDR <sub>1</sub> da Cadeia Pesada de 3B6
36	CDR <sub>2</sub> da Cadeia Pesada de 3B6
37	CDR <sub>3</sub> da Cadeia Pesada de 3B6
38	CDR <sub>1</sub> da Cadeia Leve (capa) de 3B6
39	CDR <sub>2</sub> da Cadeia Leve (capa) de 3B6
40	CDR <sub>3</sub> da Cadeia Leve (capa) de 3B6
41	Região Variável da Cadeia Pesada de 3D11 – ácido nucléico
42	Região Variável da Cadeia Pesada de 3D11 – proteína
43	Região Variável da Cadeia Leve (capa) de 3D11 – ácido nucléico
44	Região Variável da Cadeia Leve (capa) de 3D11 – proteína
45	CDR <sub>1</sub> da Cadeia Pesada de 3D11
46	CDR <sub>2</sub> da Cadeia Pesada de 3D11
47	CDR <sub>3</sub> da Cadeia Pesada de 3D11
48	CDR <sub>1</sub> da Cadeia Leve (capa) de 3D11
49	CDR <sub>2</sub> da Cadeia Leve (capa) de 3D11
50	CDR <sub>3</sub> da Cadeia Leve (capa) de 3D11
51	Região Variável da Cadeia Pesada de 1D3 – ácido nucléico
52	Região Variável da Cadeia Pesada de 1D3 – proteína
53	Região Variável da Cadeia Leve (capa) de 1D3 – ácido nucléico
54	Região Variável da Cadeia Leve (capa) de 1D3 – proteína
55	CDR <sub>1</sub> da Cadeia Pesada de 1D3

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

[000129] Também, por conveniência, as seguintes sequências representam as sequências de cadeia pesada e leve de extensão completa reais ou contempladas (isto é, contendo ambas as sequências da região variável e constante) para cada um dos anticorpos descritos neste Exemplo. Observa-se que as regiões constantes dos anticorpos murinos 2F8, 3A12, 3B6, e 3D11 não foram sequenciadas, mas supõe-se que tenham as mesmas sequências de região constante que os anticorpos 1D3, 1F3, e 2B8, os quais foram sequenciados, já que eles todos foram derivados do camundongo da cepa AJ. É observado, entretanto, que as sequências da região variável descritas aqui podem ser ligadas a cada uma de várias sequências de região constante conhecidas daqueles versados na técnica para produzir cadeias pesadas e leves ativas de imunoglobulina de extensão completa.

(1) Sequência de Ácido Nucléico que Codifica a Sequência da Cadeia

Pesada de Extensão Completa de 1A3 (Região Variável da Cadeia  
Pesada de 1A3 e Região Constante de IgG1) (sequência de sinal  
sublinhada) (SEQ ID NO. 122)

```

1      atgaactttg      ggctcagatt      gattttcctt
gtccttgttt taaaagggtgt gaagtgtgaa
61     gtgcagctgg      tggagtctgg      gggaggctta
gtgcagcctg gagggtcctt gaaactctcc
121    tgtgcagcct      ctgaattcac      tttcagtaac
tattacatgt cttgggttcg ccagactcca
181    gagaagaggc      tgcagtgggt      cgcatacatt
agtcttggtg gtggtagctc ctactatcca
241    gccagtgtga      agggtcgatt      caccatctcc
agagacaatg ccaagaacac cctgtacctg
301    caaatgagca      gtctgaagtc      tgaggacaca
gccatgtatt actgtgcaag acaaggggat
361    ggttactacg      gggactatgc      tatggactac
tgggggtcaag gaacctcagt caccgtctcc
421    tcagccaaaa      cgacaccccc      atctgtctat
ccactggccc ctggatctgc tgcccaaact
481    aactccatgg      tgaccctggg      atgcctggtc
aagggctatt tccctgagcc agtgacagtg
541    acctggaact      ctggatccct      gtccagcggg
gtgcacacct tcccagctgt cctgcagtct
601    gacctctaca      ctctgagcag      ctcagtgact
gtcccctcca gcacctggcc cagcgagacc
661    gtcacctgca      acgttgccca      cccggccagc
agcaccaagg tggacaagaa aattgtgccc
721    agggattgtg      gttgtaagcc      ttgcatatgt
acagtcccag aagtatcatc tgtcttcatc
781    ttcccccaaa      agcccaagga      tgtgctcacc
attactctga ctccctaaggt cacgtgtggt

```

841       gtggtagaca       tcagcaagga       tgatcccgag  
 gtccagttca gctggtttgt agatgatgtg  
 901       gaggtgcaca       cagctcagac       gcaaccccgg  
 gaggagcagt tcaacagcac tttccgctca  
 961       gtcagtgaac       ttcccatcat       gcaccaggac  
 tggctcaatg gcaaggagtt caaatgcagg  
 1021       gtcaacagtg       cagctttccc       tgcccccatc  
 gagaaaacca tctccaaaac caaaggcaga  
 1081       ccgaaggctc       cacaggtgta       caccattcca  
 cctcccaagg agcagatggc caaggataaa  
 1141       gtcagtctga       cctgcatgat       aacagacttc  
 ttccctgaag acattactgt ggagtggcag  
 1201       tggaatgggc       agccagcggga       gaactacaag  
 aacactcagc ccatcatgga cacagatggc  
 1261       tcttacttctg       tctacagcaa       gctcaatgtg  
 cagaagagca actgggagggc aggaaataact  
 1321       ttcacctgct       ctgtgttaca       tgagggcctg  
 cacaaccacc atactgagaa gagcctctcc  
 1381 cactctcctg gtaaatga

**(2) Sequência de Proteína que Define a Sequência da Cadeia Pesada de Extensão Completa de 1A3 (Região Variável da Cadeia Pesada de 1A3 e Região Constante de IgG1) (sem sequência de sinal) (SEQ ID NO. 123)**

1       evqlvesggg       lvqpggslkl       scaaseftfs  
 nyymswvrqt pekrlqwvay ispgggssyy  
 61       pasvkgrfti       srdnakntly       lqmsslksed  
 tamyycarqg dgyygydyamd ywgqgtsvtv  
 121       ssaktppsv       yplapgsaaq       tnsmvtlgcl  
 vkgyfpepvt vtwngslss gvhtfpavlq  
 181       sdlytlsssv       tvpsstwpse       tvtcnvahpa  
 sstkvdkkiv prdcgckpci ctvpevssvf

241 ifppkpkdvl titltpkvtc vvvdiskddp  
 evqfswfvdd vevhtaqtqp reeqfnstfr  
 301 svselfpimhq dwlngkefkc rvnsaafpap  
 iektisktkg rpkapqvyti pppkeqmakd  
 361 kvsltcmtd ffpeditvew qwngqpaeny  
 kntqpimtdt gsyfvyskln vqksnweagn  
 421 tftcsvlhheg lnhhhteksl shspgk

(3) Sequência de Ácido Nucléico que Codifica a Sequência da Cadeia  
 Leve de Extensão Completa de 1A3 (Região Variável Capa e Região  
 Constante de 1A3) (sequência de sinal sublinhada) (SEQ ID NO. 124)

1 atgagtgtgc ccactcaggt cctgggggttg  
ctgctgctgt ggcttacaga tgccagatgt  
 61 gacatccaga tgactcagtc tccagcctcc  
 ctatctgttt ctgtgggaga aactgtcacc  
 121 atcacatgtc gagcaagtga gaatatttat  
 agtaatttag catggtatca gcagaaacag  
 181 ggaaaatctc ctcagctcct ggtctatgct  
 gcaacaaact tagcagatgg tgtgccatca  
 241 aggttcagtg gcagtggatc aggcacacag  
 ttttcctca agatcaacag cctgcagtct  
 301 gaagatthttg ggacttatta ctgtcaacat  
 ttttggggta ctccgtacac gttcggaggg  
 361 gggaccaagc tggaaataaa acgggctgat  
 gctgcaccaa ctgtatccat cttcccacca  
 421 tccagtgagc agttaacatc tggaggtgcc  
 tcagtcgtgt gcttcttgaa caacttctac  
 481 cccaaagaca tcaatgtcaa gtggaagatt  
 gatggcagtg aacgacaaaa tggcgtcctg  
 541 aacagttgga ctgatcagga cagcaaagac  
 agcacctaca gcatgagcag caccctcatg  
 601 ttgaccaagg acgagtatga acgacataac

agctatacct gtgaggccac tcacaagaca  
 661 tcaacttcac ccattgtcaa gagcttcaac  
 aggaatgagt gttag

**(4) Sequência de Proteína que Define a Sequência da Cadeia Leve de Extensão Completa de 1A3 (Região Variável Capa e Região Constante) (sem sequência de sinal) (SEQ ID NO. 125)**

1 diqmtqspas lsvsvgetvt itcraseny  
 snlawyqqkq gkspqllvya atnladgvps  
 61 rfsqsgsgtq fslkinslqs edfgtyycqh  
 fwgtpytfgg gtkleikrad aaptvsifpp  
 121 sseqltsgga svvcflnnfy pkdinvkwi  
 dgserqngvl nswtdqdskd stysmsstlm  
 181 ltkdeyerhn sytceathkt stspivksfn r nec

**(5) Sequência de Ácido Nucléico que Codifica a Sequência da Cadeia Pesada de Extensão Completa de 2B8 (Região Variável da Cadeia Pesada e Região Constante de IgG1 de 2B8) (sequência de sinal sublinhada) (SEQ ID NO. 126)**

1 atgggatgga gctatatcat cctctttttg  
 gtagcaacag ctacagatgt ccactcccag  
 61 gtccaactgc agcagcctgg ggctgaactg  
 gtgaagcctg ggacttcagt gaagctgtcc  
 121 tgcaaggctt ctggctacac cttcaccacc  
 tactggatgc actgggtgaa tcagaggcct  
 181 ggacaaggcc ttgagtggat tggagagatt  
 aatcctacca acggtcatac taactacaat  
 241 gagaagttca agagcaaggc cacactgact  
 gtagacaaat cctccagcac agcctacatg  
 301 caactcagca gcctgacatc tgaggactct  
 gcgggtctatt actgtgcaag aaactatggt  
 361 ggtagcatct ttgactactg gggccaaggc  
 accactctca cagtctcctc agccaaaacg



421 acacccccat ctgtctatcc actggcccct  
ggatctgctg cccaaactaa ctccatgggtg  
481 accctgggat gcctgggtcaa gggctatttc  
cctgagccag tgacagtgac ctggaactct  
541 ggatccctgt ccagcgggtgt gcacaccttc  
ccagctgtcc tgcagtctga cctctacact  
601 ctgagcagct cagtgactgt cccctccagc  
acctggccca gcgagaccgt cacctgcaac  
661 gttgccacc cggccagcag caccaagggtg  
gacaagaaaa ttgtgcccag ggattgtggt  
721 tgtaagcctt gcatatgtac agtcccagaa  
gtatcatctg tcttcatctt cccccaaag  
781 cccaaggatg tgctcaccat tactctgact  
cctaagggtca cgtgtgttgt ggtagacatc  
841 agcaaggatg atccccgaggt ccagttcagc  
tggtttgtag atgatgtgga ggtgcacaca  
901 gctcagacgc aaccccggga ggagcagttc  
aacagcactt tccgctcagt cagtgaactt  
961 cccatcatgc accaggactg gctcaatggc  
aaggagttca aatgcagggt caacagtgca  
1021 gctttccctg ccccatcga gaaaaccatc  
tccaaaacca aaggcagacc gaaggctcca  
1081 caggtgtaca ccattccacc tcccaaggag  
cagatggcca aggataaagt cagtctgacc  
1141 tgcataataa cagacttctt ccctgaagac  
attactgtgg agtggcagtg gaatgggcag  
1201 ccagcggaga actacaagaa cactcagccc  
atcatggaca cagatggctc ttacttcgtc  
1261 tacagcaagc tcaatgtgca gaagagcaac  
tgggaggcag gaaatacttt cacctgctct  
1321 gtgttacatg agggcctgca caaccacat

actgagaaga gcctctccca ctctcctggt

1381 aaatga

**(6) Sequência de Proteína que Define a Sequência da Cadeia Pesada de Extensão Completa de 2B8 (Região Variável da Cadeia Pesada e Região Constante de IgG1 de 2B8) (sem sequência de sinal) (SEQ ID NO. 127)**

1	qvqlqqpgae	lvkpgtsvkl	sckasgytft
	tywmhwnqr	pggglewige	inptnghtny
61	nefkskatl	tvdkssstay	mqlssltsed
	savyycarny	vgsifdywgq	gttlvtvssak
121	tppsvypla	pgsaaqtnsm	vtlgclvkgy
	fpepvtvtwn	sgslssgvht	fpavlqsdly
181	tlsssvtpps	stwpsetvtc	nvahpasstk
	vdkkivprdc	gckpcictvp	evssvfifpp
241	kpkdvltitl	tpkvtcvvvd	iskddpevqf
	swfvddvevh	taqtqpreeq	fnstfrsvse
301	lpimhqdwln	gkefkcrvns	aafpapiekt
	isktkgrpka	pqvvtippk	eqmakdkvsl
361	tcmitdffpe	ditvewqwnq	qpaenykntq
	pimdtgdgsyf	vysklnvqks	nweagntftc
421	svlheglhnh	htekslshsp	gk

**(7) Sequência de Ácido Nucléico que Codifica a Sequência da Cadeia Leve de Extensão Completa de 2B8 (Região Variável Capa e Região Constante de 2B8) (sequência de sinal sublinhada) (SEQ ID NO. 128)**

1	<u>atggaatcac</u>	<u>agactctggt</u>	<u>cttcatatcc</u>
	atactgctct	ggttatatgg	tgctgatggg
61	aacattgtaa	tgaccaatc	tcccaaatcc
	atgtccatgt	cagtaggaga	gagggtcacc
121	ttgagctgca	aggccagtga	gaatgtgggtt
	tcttatgtat	cctgggatca	acagaaacca
181	gcgcagtctc	ctaaactgct	gatatacggg

gcatccaacc ggaacactgg ggtccccgat  
 241 cgcttcacag gcagtggatc tgcaacagat  
 ttcactctga ccatcagcag tgtgcgggct  
 301 gaagaccttg cagattatca ctgtgggcag  
 agttacaact atccgtacac gttcggaggg  
 361 gggaccaggc tggaaataaa acgggctgat  
 gctgcaccaa ctgtatccat cttcccacca  
 421 tccagtgagc agttaacatc tggagggtgcc  
 tcagtcgtgt gcttcttgaa caacttctac  
 481 cccaagaca tcaatgtcaa gtggaagatt  
 gatggcagtg aacgacaaaa tggcgtcctg  
 541 aacagttgga ctgatcagga cagcaaagac  
 agcacctaca gcatgagcag caccctcacg  
 601 ttgaccaagg acgagtatga acgacataac  
 agctatacct gtgaggccac tcacaagaca  
 661 tcaacttcac ccattgtcaa gagcttcaac  
 aggaatgagt gttag

**(8) Sequência de Proteína que Define a Sequência da Cadeia Leve de Extensão Completa de 2B8 (Região Variável Capa e Região Constante de 2B8) (sem sequência de sinal) (SEQ ID NO. 129)**

1 nivmtqspks msmsvgervt lsckasenvv  
 syvswyqqkp aqspklliyg asnrntgvpd  
 61 rftgsgsatd ftltissvra edladyhcgq  
 synpytfgg gtrleikrad aaptvsifpp  
 121 sseqltsgga svvcflnnfy pkdinvkwki  
 dgserqngvl nswtdqdskd stysmsstlt  
 181 ltkdeyerhn sytceathkt stspivksfn r nec

**(9) Sequência de Ácido Nucléico que Codifica a Sequência da Cadeia Pesada de Extensão Completa de 2F8 (Região Variável da Cadeia Pesada e Região Constante de IgG1 de 2F8) (sequência de sinal sublinhada) (SEQ ID NO. 130)**

1        atggaatgga        gctgggtctt        tctcttcctc  
ctgtcagtaa ctgcaggtgt ccactgccag  
 61        gtccagctga        agcagtctgg        agctgagctg  
 gtgaggcctg ggacttcagt gaagatgtcc  
 121        tgcaaggctt        ctggctacac        cttcactacc  
 tactatatac actgggtgaa tcagaggcct  
 181        ggacagggcc        ttgagtggat        tggaaagatt  
 ggtcctggaa gtggtagtag ttactacaat  
 241        gagatgttca        aagacaaggc        cacattgact  
 gtagacacat cctccagcac agcctacatg  
 301        cagctcagca        gcctgacatc        tgacgactct  
 gcggtctatt tctgtgcaag aaggggactg  
 361        ggacgtggct        ttgactactg        gggccaaggc  
 accactctca cagtctcctc agccaaaacg  
 421        acacccccat        ctgtctatcc        actggcccct  
 ggatctgctg cccaaactaa ctccatgggtg  
 481        accctgggat        gcctgggtcaa        gggctatttc  
 cctgagccag tgacagtgac ctggaactct  
 541        ggatccctgt        ccagcgggtg        gcacaccttc  
 ccagctgtcc tgcagtctga cctctacact  
 601        ctgagcagct        cagtgactgt        cccctccagc  
 acctggccca gcgagaccgt cacctgcaac  
 661        gttgcccacc        cggccagcag        caccaagggtg  
 gacaagaaaa ttgtgcccag ggattgtggt  
 721        tgtaagcctt        gcatatgtac        agtcccagaa  
 gtatcatctg tcttcatctt cccccaaag  
 781        cccaaggatg        tgctcaccat        tactctgact  
 cctaagggtca cgtgtgttgt ggtagacatc  
 841        agcaaggatg        atcccagggt        ccagttcagc  
 tggttttag atgatgtgga ggtgcacaca  
 901        gctcagacgc        aaccccggga        ggagcagttc

aacagcactt tccgctcagt cagtgaactt  
 961 cccatcatgc accaggactg gctcaatggc  
 aaggagttca aatgcagggt caacagtgca  
 1021 gctttccctg ccccatcga gaaaaccatc  
 tccaaaacca aaggcagacc gaaggctcca  
 1081 caggtgtaca ccattccacc tcccaaggag  
 cagatggcca aggataaagt cagtctgacc  
 1141 tgcatagataa cagacttctt ccctgaagac  
 attactgtgg agtggcagtg gaatgggcag  
 1201 ccagcggaga actacaagaa cactcagccc  
 atcatggaca cagatggctc ttacttcgctc  
 1261 tacagcaagc tcaatgtgca gaagagcaac  
 tgggaggcag gaaatacttt cacctgctct  
 1321 gtgttacatg agggcctgca caaccacat  
 actgagaaga gcctctccca ctctcctggt  
 1381 aatga

(10) Sequência de Proteína que Define a Sequência da Cadeia  
 Pesada de Extensão Completa de 2F8 (Região Variável da Cadeia  
 Pesada e Região Constante de IgG1 de 2F8) (sem sequência de sinal)  
 (SEQ ID NO. 131)

1 qvqlkqsgae lvrpgtsvkm sckasgytft  
 tyvihwvnqr pgqglewigk igpgsgstyy  
 61 nemfkdkatl tvdtssstay mqlssltsdd  
 savyfcarrg lgrgfdywgq gttltvssak  
 121 ttpsvypla pgsaaqtnsm vtlgclvkgy  
 fpepvtvtwn sgsllsgvht fpavlqsdly  
 181 tlsssvtvp stwpsetvvc nvahpasstk  
 vdkkivprdc gckpcictvp evssvfifpp  
 241 kpkdvltitl tpkvtcvvvd iskddpevqf  
 swfvddvevh taqtqpreeq fnstfrsvse  
 301 lpimhqdwln gkefkcrvns aafpapiekt

isktkgrpka pqvytipppk eqmakdkvsl  
 361 tcmitdffpe ditvewqwnq qpaenykntq  
 pimdtgdgsyf vysklnvqks nweagntftc  
 421 svlheglhnh htekslshsp gk

**(11) Sequência de Ácido Nucléico que Codifica a Sequência da Cadeia  
 Leve de Extensão Completa de 2F8 (Região Variável Capa e Região  
 Constante de 2F8) (sequência de sinal sublinhada) (SEQ ID NO. 132)**

1 atggagacag acacaatcct gctatgggtg  
ctgctgctct gggttccagg ctccactggt  
 61 gacattgtgc tgaccaatc tccagcttct  
 ttggctgtgt ctctagggca gagggccacc  
 121 atctcctgca aggccagcca aagtgttgat  
 tatgatggta atagttatat caactggtac  
 181 caacagaaac caggacagcc acccaaagtc  
 ctcatctatg ttgcatccaa tctagaatct  
 241 gggatcccag ccaggtttag tggcagtggg  
 tctgggacag acttcaccct caacatccat  
 301 cctgtggagg aggaggatgc tgcaacctat  
 tactgtcagc aaagtattga ggatcctccc  
 361 acgttcggtg ctgggaccaa gctggagctg  
 aaacgggctg atgctgcacc aactgtatcc  
 421 atcttcccac catccagtga gcagttaaca  
 tctggagggtg cctcagtcgt gtgcttcttg  
 481 aacaacttct accccaaaga catcaatgtc  
 aagtggaaga ttgatggcag tgaacgacaa  
 541 aatggcgtcc tgaacagttg gactgatcag  
 gacagcaaag acagcaccta cagcatgagc  
 601 agcaccctca cgttgaccaa ggacgagtat  
 gaacgacata acagctatac ctgtgaggcc  
 661 actcacaaga catcaacttc acccattgtc  
 aagagcttca acaggaatga gtggttag

**(12) Sequência de Proteína que Define a Sequência da Cadeia Leve de Extensão Completa de 2F8 (Região Variável Capa e Região Constante de 2F8) (sem sequência de sinal) (SEQ ID NO. 133)**

1 divltqspas lavslgqrat isckasqsvd  
 ydgnsyinwy qqkpggppkv liyvasnles  
 61 giparfsgsg sgt dftlnih pveeedaaty  
 ycqqsiedpp tfgagtklel kradaaptvs  
 121 ifppsseqlt sggasvvcfl nnfypkdinv  
 kwkidgserq ngvlnswtdq dskdstysms  
 181 stltltkdey erhnsytcea thktstspiv ksfnrnec

**(13) Sequência de Ácido Nucléico que Codifica a Sequência da Cadeia Pesada de Extensão Completa de 3B6 (Região Variável da Cadeia Pesada e Região Constante de IgG1 de 3B6) (sequência de sinal sublinhada) (SEQ ID NO. 134)**

1 atggaatggc cttgatatctt tctcttcctc  
 ctgtcagtaa ctgaaggtgt cactcccag  
 61 gttcagctgc agcagtctgg ggctgaactg  
 gtgaggcctg ggtcctcagt gaagatttcc  
 121 tgcaaggctt ctggctatgt attcagtagc  
 tactggatga actgggtgaa gcagaggcct  
 181 ggacagggtc ttgagtggat tggacagatt  
 tatcctggag atggtgatag taactacaat  
 241 ggaaacttca agggtaaagc cacactgact  
 gcagacaaat cctccagtac agcctacatg  
 301 cagctcagca gcctaacatc tgaggactct  
 gcggtctatt tctgtgcatc ccagctcggg  
 361 ctacgtgaga actactttga ctactggggc  
 caaggcacca ctctcacagt ctctcagcc  
 421 aaaacgacac ccccatctgt ctatccactg  
 gccctggat ctgctgcca aactaactcc  
 481 atggtgaccc tgggatgcct ggtcaagggc

tatttccctg agccagtgac agtgacctgg  
 541 aactctggat ccctgtccag cgggtgtgcac  
 accttcccag ctgtcctgca gtctgacctc  
 601 tacactctga gcagctcagt gactgtcccc  
 tccagcacct ggcccagcga gaccgtcacc  
 661 tgcaacgttg cccacccggc cagcagcacc  
 aaggtggaca agaaaattgt gccagggat  
 721 tgtggttgta agccttgcac atgtacagtc  
 ccagaagtat catctgtctt catcttcccc  
 781 ccaaagccca aggatgtgct caccattact  
 ctgactccta aggtcacgtg tgttggtgga  
 841 gacatcagca aggatgatcc cgagggtccag  
 ttcagctggt ttgtagatga tgtggaggtg  
 901 cacacagctc agacgcaacc ccgggaggag  
 cagttcaaca gcactttccg ctgagtcagt  
 961 gaacttccca tcatgcacca ggactggctc  
 aatggcaagg agttcaaag caggggtcaac  
 1021 agtgcagctt tccctgcccc catcgagaaa  
 accatctcca aaaccaaagg cagaccgaag  
 1081 gctccacagg tgtacaccat tccacctccc  
 aaggagcaga tggccaagga taaagtcagt  
 1141 ctgacctgca tgataacaga cttcttccct  
 gaagacatta ctgtggagtg gcagtggaat  
 1201 gggcagccag cggagaacta caagaacact  
 cagcccatca tggacacaga tggctcttac  
 1261 ttcgtctaca gcaagctcaa tgtgcagaag  
 agcaactggg aggcaggaaa tactttcacc  
 1321 tgctctgtgt tacatgaggg cctgcacaac  
 caccatactg agaagagcct ctcccactct  
 1381 cctggtaaat ga

**(14) Sequência de Proteína que Define a Sequência da Cadeia**



Pesada de Extensão Completa de 3B6 (Região Variável da Cadeia Pesada e Região Constante de IgG1 de 3B6) (sem sequência de sinal) (SEQ ID NO. 135)

1       qvqlqqsgae       lvrrpgssvki       sckasgyvfs  
 sywmnwvkqr pgqglewigq iypgdgdsny  
 61       ngnfkgkatl       tadkssstay       mqlssltsed  
 savyfcasql glrenyfdyw gqgttltvss  
 121       aktppsvyp       lapgsaaqtn       smvtlgclvk  
 gyfpepvtvt wnsqslssgv htfpavlqsd  
 181       lytlsssvtv       psstwpsetv       tcnvahpass  
 tkvdkkivpr dgcckpcict vpevssvfif  
 241       ppkpkdvlti       tltpkvtcvv       vdiskddpev  
 qfswfvddve vhtaqtqpre eqfnstfrsv  
 301       selpimhqdw       lngkefkcrv       nsaafpapie  
 ktisktkgrp kapqvytipp pkeqmakdkv  
 361       sltcmtdff       peditvewqw       ngqpaenykn  
 tqpimtdtgs yfvysklvq ksnweagntf  
 421       tcsvlhheglh nhhtekslsh spgk

(15) Sequência de Ácido Nucléico que Codifica a Sequência da Cadeia Leve de Extensão Completa de 3B6 (Região Variável Capa e Região Constante de 3B6) (sequência de sinal sublinhada) (SEQ ID NO. 136)

1       ATGgacATGa       ggaccctgc       tcagtttctt  
 ggaatcttgt tgctctgggt tccaggtatc  
 61       aatgtgaca       tcaagatgac       ccagtctcca  
 tcttccatgt atgcatctct aggagagaga  
 121       gtcacaatca       cttgcaaggc       gagtcaggac  
 attaaaagct atttaagctg gttccagcag  
 181       aaaccagga       aatctcctaa       gaccctgatc  
 tatcgtgtaa acagattggt agatggggtc  
 241       ccatcaaggt       tcagtggcag       tggatctggg  
 caagattctt ctctcaccat caccagcctg

301 gagaatgaag atatgggaat ttattattgt  
 ctacagtatg atgagtttcc gttcacgttc  
 361 ggagggggga ccaagctgga aataaagcgg  
 gctgatgctg caccaactgt atccatcttc  
 421 ccaccatcca gtgagcagtt aacatctgga  
 ggtgcctcag tcgtgtgctt cttgaacaac  
 481 ttctaccca aagacatcaa tgtcaagtgg  
 aagattgatg gcagtgaacg acaaaatggc  
 541 gtcttgaaca gttggactga tcaggacagc  
 aaagacagca cctacagcat gagcagcacc  
 601 ctcacgttga ccaaggacga gtatgaacga  
 cataacagct atacctgtga ggccactcac  
 661 aagacatcaa cttcacccat tgtcaagagc  
 ttcaacagga atgagtgtta g

**(16) Sequência de Proteína que Define a Sequência da Cadeia Leve de Extensão Completa de 3B6 (Região Variável Capa e Região Constante de 3B6) (sem sequência de sinal) (SEQ ID NO. 137)**

1 dikmtqspss myaslgervt itckasqdik  
 sylswfqqkp gkspktliyr vnrlvdgvps  
 61 rfsqsgsgqd ssltitslen edmgiyyclq  
 ydefpftfgg gtkleikrad aaptvsifpp  
 121 sseqltsgga svvcflnnfy pkdinvkwki  
 dgserqngvl nswtdqdskd stysmsstlt  
 181 ltkdeyerhn sytceathkt stspivksfn r nec

**(17) Sequência de Ácido Nucléico que Codifica a Sequência da Cadeia Pesada de Extensão Completa de 3D11 (Região Variável da Cadeia Pesada e Região Constante de IgG1 de 3D11) (sequência de sinal sublinhada) (SEQ ID NO. 138)**

1 atggctgtcc cggtgctggt cctctgctg  
gttgcatctc caagctgtgt cctgtcccag  
 61 gtacagctga aggagtcagg acctggcctg

gtggcgccct cacagagcct gtccatcact  
121 tgcactgtct ctggggttttc attaaccagc  
tatagtttac actgggttcg ccagcctcca  
181 ggaaagggtc tggaatggct gggagtaata  
tgggctgggtg gaaacacaaa ttataattcg  
241 tctctcatgt ccagactgac catcaggaaa  
gacaactcca agagccaagt tttcttaaaa  
301 atgaacagtc tgcaaactga tgacacagcc  
atgtactact gtgccagaga gaggtttgct  
361 tactggggcc aagggactct ggtcactgtc  
tctgcagcca aaacgacacc cccatctgtc  
421 tatccactgg cccctggatc tgctgcccaa  
actaactcca tggtgaccct gggatgcctg  
481 gtcaagggtc atttccctga gccagtgaca  
gtgacctgga actctggatc cctgtccagc  
541 ggtgtgcaca ccttcccagc tgtcctgcag  
tctgacctct aactctgag cagctcagtg  
601 actgtcccct ccagcacctg gccagcgcag  
accgtcacct gcaacgttgc ccacccggcc  
661 agcagcacca aggtggacaa gaaaattgtg  
cccagggatt gtggttgtaa gccttgcata  
721 tgtacagtcc cagaagtatc atctgtcttc  
atcttcccc caaagcccaa ggatgtgctc  
781 accattactc tgactcctaa ggtcacgtgt  
gttgtggtag acatcagcaa ggatgatccc  
841 gaggtccagt tcagctggtt tgtagatgat  
gtggaggtgc acacagctca gacgcaacc  
901 cgggaggagc agttcaacag cactttccgc  
tcagtcagtg aacttcccat catgcaccag  
961 gactggctca atggcaagga gttcaaatgc  
agggtaaca gtgcagcttt cctgcccc

1021 atcgagaaaa ccatctccaa aaccaaggg  
 agaccgaagg ctccacaggt gtacaccatt  
 1081 ccacctccca aggagcagat ggccaaggat  
 aaagtcagtc tgacctgcat gataacagac  
 1141 ttcttccctg aagacattac tgtggagtgg  
 cagtggaatg ggcagccagc ggagaactac  
 1201 aagaacactc agcccatcat ggacacagat  
 ggctcttact tcgtctacag caagctcaat  
 1261 gtgcagaaga gcaactggga ggcaggaaat  
 actttcacct gctctgtgtt acatgagggc  
 1321 ctgcacaacc accataactga gaagagcctc  
 tcccactctc ctggtaaata a

**(18) Sequência de Proteína que Define a Sequência da Cadeia Pesada de Extensão Completa de 3D11 (Região Variável da Cadeia Pesada e Região Constante de IgG1 de 3D11) (sem sequência de sinal) (SEQ ID NO. 139)**

1 qvqlkesgpg lvapsqslsi tctvsgfslt  
 syslhwvrqp pgkglewlgv iwaggntnyn  
 61 sslmsrltir kdnsksqvfl kmnslqtddt  
 amyycarerf aywgqgtlvt vsaaktpps  
 121 vyplapgsaa qtmsmvtlgc lvkgyfpepv  
 tvtwngspls sgvhtfpavl qsdlytlsss  
 181 vtvpsstwps etvtcnvahp asstkvdkki  
 vprdcgckpc ictvpevssv fifppkpkdv  
 241 ltitltpkvt cvvvdiskdd pevqfswfvd  
 dvevhtaqtq preeqfnstf rsvselpimh  
 301 qdwlngkefk crvnsaafpa piektisktk  
 grpkapqvvt ippkqemak dkvsltcmit  
 361 dffpeditve wqwnqpaen ykntqpimdt  
 dgsyfvyskl nvqksnweag ntftcsvghe  
 421 glnhhhteks lshspgk

**(19) Sequência de Ácido Nucléico que Codifica a Sequência da Cadeia Leve de Extensão Completa de 3D11 (Região Variável Capa e Região Constante de 3D11) (sequência de sinal sublinhada) (SEQ ID NO. 140)**

```

      1      atggattttc      aagtgcagat      tttcagcttc
ctgctaataca gtcctcagtc caaaatatcc
      61      agaggacaaa      ttgttctcac      ccagtctcca
gcaatcatgt ctgcatatcc aggggagaag
     121      gtcacatga      cctgcagtc      cagctcaagt
gtaagttaca tgcactggta ccagcagaag
     181      tcaggcacct      ccccaaaaag      atggatttat
gacacatcca aactggcttc tggagtcct
     241      gctcgcttca      gtggcagtc      gtctgggacc
tcttactccc tcacaatcag tagtatggag
     301      gctgaagatg      ctgccactta      ttactgccag
cagtgagta gtaaccact cacgttcggt
     361      gctgggacca      agctggagct      gaaacgggct
gatgctgcac caactgtatc catcttcca
     421      ccatccagtg      agcagttaac      atctggaggt
gcctcagtcg tgtgcttctt gaacaacttc
     481      taccocaaag      acatcaatgt      caagtggaag
attgatggca gtgaacgaca aatggcgtc
     541      ctgaacagtt      ggactgatca      ggacagcaaa
gacagcacct acagcatgag cagcacctc
     601      acgttgacca      aggacgagta      tgaacgacat
aacagctata cctgtgaggc cactcacaag
     661      acatcaactt      caccattgt      caagagcttc
aacaggaatg agtgtag

```

**(20) Sequência de Proteína que Define a Sequência da Cadeia Leve de Extensão Completa de 3D11 (Região Variável Capa e Região Constante de 3D11) (sem sequência de sinal) (SEQ ID NO. 141)**

1        qivltqspai        msaypgekvt        mtcsasssvs  
 ymhwyqqksg tspkrwiydt sklasgvpar  
 61        fsgsgsgtsy        sltissmeae        daatyycqqw  
 ssnpltfagag tklelkrada aptvsifpps  
 121       seqltsggas        vvcflnnfyp        kdinvkwkid  
 gserqngvln swtdqdskds tysmsstltl  
 181 tkdeyerhns ytceathkts tspivksfnr nec

(21) Sequência de Ácido Nucléico que Codifica a Sequência da Cadeia  
 Pesada de Extensão Completa de 1D3 (Região Variável da Cadeia  
 Pesada e Região Constante de IgG1 de 1D3) (sequência de sinal  
 sublinhada) (SEQ ID NO. 142)

1        atgaactttg        ggctcagatt        gattttcctt  
gtccttgttt taaaagggtg gaagtgtgaa  
 61        gtgcagctgg        tggagtctgg        gggaggctta  
 gtgcagcctg gagggtcctt gaaactctcc  
 121       tgtgcagcct        ctggattcac        tttcagtgac  
 tattacatgt cttgggttcg ccagactcca  
 181       gagaagaggc        tggagtgggt        cgcatacatt  
 agtagtgggtg gtggtagcac ctactatcca  
 241       gacagtgtga        agggtcgatt        caccatctcc  
 cgagacaatg ccaagaacac cctgtacctg  
 301       caaatgagca        gtctgaagtc        tgaggacaca  
 gccatatatt actgtgtgag acaaggggat  
 361       ggttattacg        gggactatgc        tatggactac  
 tgggggtcaag gaacctcagt catcgtctcc  
 421       tcagccaaaa        cgacaccccc        atctgtctat  
 ccaactggccc ctggatctgc tgcccaaact  
 481       aactccatgg        tgaccctggg        atgcctggtc  
 aagggttatt tccctgagcc agtgacagtg  
 541       acctggaact        ctggatccct        gtccagcggg  
 gtgcacacct tcccagctgt cctgcagtct

601 gacctctaca ctctgagcag ctcagtgact  
 gtccccctcca gcacctggcc cagcgagacc  
 661 gtcacctgca acgttgccca cccggccagc  
 agcaccaagg tggacaagaa aattgtgccc  
 721 agggattgtg gttgtaagcc ttgcatatgt  
 acagtcccag aagtatcatc tgtcttcatc  
 781 ttccccccaa agcccaagga tgtgctcacc  
 attactctga ctccctaaggt cacgtgtgtt  
 841 gtggtagaca tcagcaagga tgatcccagc  
 gtccagttca gctggtttgt agatgatgtg  
 901 gaggtgcaca cagctcagac gcaaccccgg  
 gaggagcagt tcaacagcac tttccgctca  
 961 gtcagtgaac ttcccatcat gcaccaggac  
 tggctcaatg gcaaggagtt caaatgcagg  
 1021 gtcaacagtg cagctttccc tgcccccatc  
 gagaaaacca tctccaaaac caaaggcaga  
 1081 ccgaaggctc cacaggtgta caccattcca  
 cctcccaagg agcagatggc caaggataaa  
 1141 gtcagtctga cctgcatgat aacagacttc  
 ttccctgaag acattactgt ggagtggcag  
 1201 tggaatgggc agccagcggga gaactacaag  
 aacactcagc ccatcatgga cacagatggc  
 1261 tcttacttcg tctacagcaa gctcaatgtg  
 cagaagagca actgggaggc aggaaatact  
 1321 ttcacctgct ctgtgttaca tgagggcctg  
 cacaaccacc atactgagaa gagcctctcc  
 1381 cactctcctg gtaaatga

(22) Sequência de Proteína que Define a Sequência da Cadeia  
Pesada de Extensão Completa de 1D3 (Região Variável da Cadeia  
Pesada e Região Constante de IgG1 de 1D3) (sem sequência de sinal)  
 (SEQ ID NO. 143)

1 evqlvesggg lvqpggslkl scaasgftfs  
 dyymswvrqt pekrlewvay issgggstyy  
 61 pdsvkgrfti srdnakntly lqmsslksed  
 taiyycvrqg dgyygdyamd ywgqgtsviv  
 121 ssakttppsv yplapgsaaq tnsmtlgcl  
 vkgyfpepvt vtwngslss gvhtfpavlq  
 181 sdlytlsssv tvpsstwpse tvtcnvahpa  
 sstkvdkkiv prdcgckpci ctvpevssvf  
 241 ifppkpkdvl titltpkvtc vvvdiskddp  
 evqfswfvdd vevhtaqtqp reeqfnstfr  
 301 svselpimhq dwlngkefkc rvnsaafpap  
 iektisktkg rpkapqvyti pppkeqmakd  
 361 kvsltcmid ffpeditvew qwngqpaeny  
 kntqpimtdt gsyfvyskln vqksnweagn  
 421 tftcsvlheg lnhhhteksl shspgk

**(23) Sequência de Ácido Nucléico que Codifica a Sequência da Cadeia Leve de Extensão Completa de 1D3 (Região Variável Capa e Região Constante de 1D3) (sequência de sinal sublinhada) (SEQ ID NO. 144)**

1 atgagtgtgc ccactcaggt cctgggggttg  
ctgctgctgt ggcttacaga tgtcagatgt  
 61 gacatccaga tgactcagtc tccagcctcc  
 ctatctgtat ctgtgggaga aactgtcacc  
 121 atcacatgtc gaacaagtga gaatatttac  
 agtaatttag cgtggatatca gcagaaacag  
 181 ggaaaatctc ctcagctcct aatctatgct  
 gcaacaaact tagcagatgg tgtgccatca  
 241 aggttcagtg gcagtgatc aggcacacag  
 ttttcctca ggatcaacag cctgcagtct  
 301 gaagatthttg ggaggtatta ctgtcaacat  
 ttttggggga ctccgtacac gttcggaggg



361      gggaccaaac      tggaaataaa      acgggctgat  
 gctgcaccaa ctgtatccat cttcccacca  
 421      tccagtgagc      agttaacatc      tggaggtgcc  
 tcagtcgtgt gcttcttgaa caacttctac  
 481      cccaaagaca      tcaatgtcaa      gtggaagatt  
 gatggcagtg aacgacaaaa tggcgtcctg  
 541      aacagttgga      ctgatcagga      cagcaaagac  
 agcacctaca gcatgagcag caccctcacg  
 601      ttgaccaagg      acgagtatga      acgacataac  
 agctatacct gtgaggccac tcacaagaca  
 661      tcaacttcac      ccattgtcaa      gagcttcaac  
 aggaatgagt gttag

**(24) Sequência de Proteína que Define a Sequência da Cadeia Leve de Extensão Completa de 1D3 (Região Variável Capa e Região Constante de 1D3) (sem sequência de sinal) (SEQ ID NO. 145)**

1      diqmtqspas      lsvsvgetvt      itcrtseniy  
 snlawyqqkq gkspqlliya atnladgvps  
 61      rfsgsgsgtq      fslrinlslqs      edfgryycqh  
 fwgtpytfgg gtkleikrad aaptvsifpp  
 121      sseqltsgga      svcflnnfy      pkdinvkwki  
 dgserqngvl nswtdqdskd stysmsstlt  
 181 ltkdeyerhn sytceathkt stspivksfn rnc

**(25) Sequência de Ácido Nucléico que Codifica a Sequência da Cadeia Pesada de Extensão Completa de 1F3 (Região Variável da Cadeia Pesada e Região Constante de IgG1 de 1F3) (sequência de sinal sublinhada) (SEQ ID NO. 146)**

1      atgaactttg      ggctcagatt      gattttcctt  
gtccttgttt taaaaggtgt gaagtgtgag  
 61      gtgcagctgg      tggagtctgg      gggaggctta  
 gtgcagtctg gagggtcctt gaaactctcc  
 121      tgtgcggcct      ctggattcac      tttcagtaac

tatttcatgt cttgggttcg ccagactcca  
181 gagaagaggc tggagtgggt cgcatatatt  
agtagtgggtg gtggtagcac ctactatcca  
241 gacagtgtga agggtcgatt caccatctct  
agagacaatg ccaagaacac cctgtacctg  
301 caaatgagca gtctgaagtc tgaggacaca  
gccatgtatt actgtgtaag acaaggggat  
361 ggttactacg gggactatgc tatggactac  
tgggggtcaag gaacctcagt caccgtctcc  
421 tcagccaaaa cgacaccccc atctgtctat  
ccactggccc ctggatctgc tgcccaaact  
481 aactccatgg tgaccctggg atgcctggtc  
aagggttatt tccctgagcc agtgacagtg  
541 acctggaact ctggatccct gtccagcggg  
gtgcacacct tcccagctgt cctgcagtct  
601 gacctctaca ctctgagcag ctcagtgact  
gtcccctcca gcacctggcc cagcgagacc  
661 gtcacctgca acgttgccca cccggccagc  
agcaccaagg tggacaagaa aattgtgccc  
721 agggattgtg gttgtaagcc ttgcatatgt  
acagtcccag aagtatcatc tgtcttcatc  
781 ttcccccaa agcccaagga tgtgctcacc  
attactctga ctccctaaggt cacgtgtggt  
841 gtggtagaca tcagcaagga tgatcccag  
gtccagttca gctggtttgt agatgatgtg  
901 gaggtgcaca cagctcagac gcaaccccgg  
gaggagcagt tcaacagcac tttccgctca  
961 gtcagtgaac ttcccatcat gcaccaggac  
tggtcaatg gcaaggagtt caaatgcagg  
1021 gtcaacagtg cagctttccc tgcccccatc  
gagaaaacca tctccaaaac caaaggcaga

1081 ccgaaggctc cacaggtgta caccattcca  
 cctcccaagg agcagatggc caaggataaa  
 1141 gtcagtctga cctgcatgat aacagacttc  
 ttccctgaag acattactgt ggagtggcag  
 1201 tggaatgggc agccagcgga gaactacaag  
 aacactcagc ccatcatgga cacagatggc  
 1261 tcttacttcg tctacagcaa gctcaatgtg  
 cagaagagca actgggaggc aggaaatact  
 1321 ttcacctgct ctgtgttaca tgagggcctg  
 cacaaccacc atactgagaa gagcctctcc  
 1381 cactctcctg gtaaatga

**(26) Sequência de Proteína que Define a Sequência da Cadeia Pesada de Extensão Completa de 1F3 (Região Variável da Cadeia Pesada e Região Constante de IgG1 de 1F3) (sem sequência de sinal) (SEQ ID NO. 147)**

1 evqlvesggg lvqsggslkl scaasgftfs  
 nyfmswvrrt pekrlewvay issgggstyy  
 61 pdsvkgrfti srdnakntly lqmsslksed  
 tamyycivrqq dgyygdyamd ywgqgtsvtv  
 121 ssaktppsv yplapgsaaq tnsmtlgcl  
 vkgyfpepvt vtwngslss gvhtfpavlq  
 181 sdlytlsssv tvpsstwpse tvtcnvahpa  
 sstkvdkkiv prdcgckpci ctvpevssvf  
 241 ifppkpkdvl titltpkvtc vvvdiskddp  
 evqfswfvdd vevhtaqtqp reeqfnstfr  
 301 vselpimhq dwlngkefkcv rnsaafpap  
 iektisktkg rpkapqvyti pppkeqmakd  
 361 kvsltcmtd ffpeditvew qwngqpaeny  
 kntqpimtdt gsyfvyskln vqksnweagn  
 421 tftcsvglh eg lnhhhteksl shspgk

**(27) Sequência de Ácido Nucléico que Codifica a Sequência da Cadeia**

**Leve de Extensão Completa de 1F3 (Região Variável Capa e Região Constante de 1F3) (sequência de sinal sublinhada) (SEQ ID NO. 148)**

1	<u>atgagtg</u> tg	<u>ccactcag</u> gt	<u>cctgggg</u> ttg
	<u>ctgctg</u> ctgt	<u>ggctta</u> caga	<u>tgccaga</u> tgt
61	gacatccaga	tgactcagtc	tccagcctcc
	ctatctgtat	ctgtgggaga	aactgtcacc
121	atcacatg	gagcaagtga	gaatatttac
	agtaatttag	catggtatca	gcagaaacag
181	ggaaaatctc	ctcagctcct	ggtctatgat
	gcaacacact	taccagatgg	tgtgccatca
241	aggttcagtg	gcagtgatc	aggcacacag
	tttccctca	agatcaacag	cctgcagtct
301	gaagattttg	ggagttatta	ctgtcaacat
	ttttggggta	ctccgtacac	gtttggaggg
361	gggaccagac	tggaaattaa	acgggctgat
	gctgcaccaa	ctgtatccat	cttcccacca
421	tccagtgagc	agttaacatc	tggaggtgcc
	tcagtcgtgt	gcttcttgaa	caacttctac
481	cccaaagaca	tcaatgtcaa	gtggaagatt
	gatggcagtg	aacgacaaaa	tggcgtcctg
541	aacagttgga	ctgatcagga	cagcaaagac
	agcacctaca	gcatgagcag	caccctcacg
601	ttgaccaagg	acgagtatga	acgacataac
	agctatacct	gtgaggccac	tcacaagaca
661	tcaacttcac	ccattgtcaa	gagcttcaac
	aggaatgagt	gtag	

**(28) Sequência de Proteína que Define a Sequência da Cadeia Leve de Extensão Completa de 1F3 (Região Variável Capa e Região Constante de 1F3) (sem sequência de sinal) (SEQ ID NO. 149)**

1	diqmtqspas	lsvsvgetvt	itcraseny
	snlawyqqkq	gkspqllvyd	athlpgvps

61 r fsgsgsgtq fslkinslqs edfgsyycqh  
 fwgtpytfgg gtrleikrad aaptvsifpp  
 121 sseqltsgga svvcflnnfy pkdinvkwki  
 dgserqngvl nswtdqdskd stysmsstlt  
 181 ltkdeyerhn sytceathkt stspivksfn r nec

**(29) Sequência de Ácido Nucléico que Codifica a Sequência da Cadeia Pesada de Extensão Completa de 3A12 (Região Variável da Cadeia Pesada e Região Constante de IgG1 de 3A12) (sequência de sinal sublinhada) (SEQ ID NO. 150)**

1 atgaactttg ggctcagatt gattttcctt  
gtccttgttt taaaaggtgt gaagtgtgaa  
 61 gtgcagctgg tggagtctgg gggaggctta  
 gtgcagcctg gagggtcctt gaaaatctcc  
 121 tgtgcagcct ctggatttac tttcagtaac  
 tatttcatgt cttgggttcg ccagactcca  
 181 gagaagaggc tggagtgggt cgcatacatt  
 agtagtgggt gtggtagcac ctactatcca  
 241 gacagtgtga agggtcgatt caccatctcc  
 agagacaatg ccaagaacac cctgtacctg  
 301 caaatgaaca gtctgaagtc tgaggacaca  
 gccatgtatt actgtgtaag acaaggagat  
 361 ggttactatg gggactatgc tatggactac  
 tgggggtcaag gaacctcagt caccgtctcc  
 421 tcagccaaaa cgacaccccc atctgtctat  
 ccactggccc ctggatctgc tgcccaaact  
 481 aactccatgg tgaccctggg atgcctggtc  
 aagggctatt tccctgagcc agtgacagtg  
 541 acctggaact ctggatccct gtccagcggg  
 gtgcacacct tcccagctgt cctgcagtct  
 601 gacctctaca ctctgagcag ctcagtgact  
 gtccccctcca gcacctggcc cagcgagacc

661 gtcacctgca acgttgccca cccggccagc  
 agcaccaagg tggacaagaa aattgtgccc  
 721 agggattgtg gttgtaagcc ttgcatatgt  
 acagtcccag aagtatcatc tgtcttcatc  
 781 ttccccccaa agcccaagga tgtgctcacc  
 attactctga ctccctaaggt cacgtgtggt  
 841 gtggtagaca tcagcaagga tgatcccagc  
 gtccagttca gctggtttgt agatgatgtg  
 901 gaggtgcaca cagctcagac gcaaccccgg  
 gaggagcagt tcaacagcac tttccgctca  
 961 gtcagtgaac ttcccatcat gcaccaggac  
 tggctcaatg gcaaggagtt caaatgcagg  
 1021 gtcaacagtg cagctttccc tgccccatc  
 gagaaaacca tctccaaaac caaaggcaga  
 1081 ccgaaggctc cacaggtgta caccattcca  
 cctcccaagg agcagatggc caaggataaa  
 1141 gtcagtctga cctgcatgat aacagacttc  
 ttccctgaag acattactgt ggagtggcag  
 1201 tggaatgggc agccagcggga gaactacaag  
 aacactcagc ccatcatgga cacagatggc  
 1261 tcttacttcg tctacagcaa gctcaatgtg  
 cagaagagca actgggagggc aggaaataact  
 1321 ttcacctgct ctgtgttaca tgagggcctg  
 cacaaccacc atactgagaa gagcctctcc  
 1381 cactctcctg gtaaatga

**(30) Sequência de Proteína que Define a Sequência da Cadeia Pesada de Extensão Completa de 3A12 (Região Variável da Cadeia Pesada e Região Constante de IgG1 de 3A12) (sem sequência de sinal) (SEQ ID NO. 151)**

1 evqlvesggg lvqpggslki scaasgftfs  
 nyfmswvrrt pekrlewvay issgggstyy

61 pdsvkgrfti srdnakntly lqmnslkxed  
 tamyycvrqg dgyygyamd ywgqgtsvtv  
 121 ssakttppsv yplapgsaaq tnsmtlglcl  
 vkgyfpepvt vtwngslss gvhtfpavlq  
 181 sdlytlsssv tvpsstwpse tvtcnvahpa  
 sstkvdkkiv prdcgckpci ctvpevssvf  
 241 ifppkpkdvl titltpkvtc vvdiskddp  
 evqfswfvdd vevhtaqtqp reeqfnstfr  
 301 svselpimhq dwlngkefkc rvnsaafpap  
 iektisktkg rpkapqvyti pppkeqmakd  
 361 kvsltcmtd ffpeditvew qwngqpaeny  
 kntqpimtdt gsyfvyskln vqksnweagn  
 421 tftcsvlheg lnhhhteksl shspgk

**(31) Sequência de Ácido Nucléico que Codifica a Sequência da Cadeia Leve de Extensão Completa de 3A12 (Região Variável Capa e Região Constante de 3A12) (sequência de sinal sublinhada) (SEQ ID NO. 152)**

1 atgagtgtgc cactcaggt cctgggggttg  
ctgctgctgt ggcttacaga tgccagatgt  
 61 gacatccaga tgactcagtc gccagcctcc  
 ctatctgtat ctgtgggaga aactgtcacc  
 121 atcacatgtc gagcaagtga gaatatttac  
 attaatttag catggtatca gcagaaacag  
 181 ggaaaatctc ctcagctcct ggtccatgct  
 gcaacaaagt tagcagatgg tgtgccatca  
 241 aggttcagtg gcagtggatc aggcacacag  
 tattccctca agatcaacag cctgcagtct  
 301 gaagatthttg ggagttatta ctgtcaacat  
 ttttggggta ctccgtacac gttcggaggg  
 361 gggaccaaac tagaaataaa acgggctgat  
 gctgcaccaa ctgtatccat cttcccacca  
 421 tccagtgagc agttaacatc tggaggtgccc

tcagtcgtgt gcttcttgaa caacttctac  
 481 cccaaagaca tcaatgtcaa gtggaagatt  
 gatggcagtg aacgacaaaa tggcgtcctg  
 541 aacagttgga ctgatcagga cagcaaagac  
 agcacctaca gcatgagcag caccctcacg  
 601 ttgaccaagg acgagtatga acgacataac  
 agctatacct gtgaggccac tcacaagaca  
 661 tcaacttcac ccattgtcaa gagcttcaac  
 aggaatgagt gttag

**(32) Sequência de Proteína que Define a Sequência da Cadeia Leve de Extensão Completa de 3A12 (Região Variável Capa e Região Constante de 3A12) (sem sequência de sinal) (SEQ ID NO. 153)**

1 diqmtqspas lsvsvgetvt itcraseny  
 inlawyqqkq gkspqllvha atkladgvps  
 61 rfsqsgsgtq yslkinslqs edfgsyycqh  
 fwgtpytfgg gtkleikrad aaptvsifpp  
 121 sseqltsgga svvcflnnfy pkdinvkwi  
 dgserqngvl nswtdqdskd stysmsstlt  
 181 ltkdeyerhn sytceathkt stspivksfn r nec

[000130] Por conveniência, a Tabela 2 fornece um quadro de concordância que mostra a correspondência entre as sequências de extensão completa dos anticorpos discutidos neste Exemplo com aqueles apresentados na Listagem de Sequência.

**TABELA 2**

SEQ. ID NO.	Proteína ou Ácido Nucléico
122	Variável + constante de IgG1 Pesada de 1A3 – ácido nucléico
123	Variável + constante de IgG1 Pesada de 1A3– proteína
124	Variável Leve + constante de 1A3 – ácido nucléico
125	Variável Leve + constante de 1A3 – proteína
126	Variável + constante de IgG1 Pesada de 2B8 – ácido nucléico
127	Variável + constante de IgG1 Pesada de 2B8 – proteína
128	Variável + constante Leve de 2B8 – ácido nucléico
129	Variável + constante Leve de 2B8 – proteína
130	Variável + constante de IgG1 Pesada de 2F8 – ácido nucléico
131	Variável + constante de IgG1 Pesada de 2F8 – proteína



SEQ. ID NO.	Proteína ou Ácido Nucléico
132	Variável + constante Leve de 2F8 – ácido nucléico
133	Variável + constante Leve de 2F8 – proteína
134	Variável + constante de IgG1 Pesada de 3B6 – ácido nucléico
135	Variável + constante de IgG1 Pesada de 3B6 – proteína
136	Variável + constante Leve de 3B6 – ácido nucléico
137	Variável + constante Leve de 3B6 – proteína
138	Variável + constante de IgG1 Pesada de 3D11 – ácido nucléico
139	Variável + constante de IgG1 Pesada de 3D11 – proteína
140	Variável + constante Leve de 3D11 – ácido nucléico
141	Variável + constante Leve de 3D11 – proteína
142	Variável + constante de IgG1 Pesada de 1D3 – ácido nucléico
143	Variável + constante de IgG1 Pesada de 1D3 – proteína
144	Variável + constante Leve de 1D3 – ácido nucléico
145	Variável + constante Leve de 1D3 – proteína
146	Variável + constante de IgG1 Pesada de 1F3 – ácido nucléico
147	Variável + constante de IgG1 Pesada de 1F3 – proteína
148	Variável + constante Leve de 1F3 – ácido nucléico
149	Variável + constante Leve de 1F3 – proteína
150	Variável + constante de IgG1 Pesada de 3A12 – ácido nucléico
151	Variável + constante de IgG1 Pesada de 3A12 – proteína
152	Variável + constante Leve de 3A12 – ácido nucléico
153	Variável + constante Leve de 3A12 – proteína

### Exemplo 3 – Produção de Várias Proteínas hHGF Recombinantes

[000131] Este Exemplo descreve a clonagem e expressão de várias proteínas recombinantes usadas para caracterizar os anticorpos criados no Exemplo 1 e no Exemplo 14. Em particular, este Exemplo descreve a clonagem e expressão da proteína hHGF recombinante, uma proteína hHGF recombinante que contém uma substituição de glicina para glutamato na posição 555 (G555E), uma proteína hHGF recombinante que contém uma substituição de cisteína para arginina na posição 561 (C561R), uma proteína HGF quimérica camundongo-humano-camundongo (mhm) recombinante contendo a sequência de HGF V495-L585 humana disposta dentro da sequência de HGF de camundongo, uma proteína de HGF quimérica mhm recombinante contendo a sequência de HGF I499-R566 humana disposta dentro da sequência de HGF de camundongo, e uma proteína de HGF quimérica mhm recombinante contendo a sequência de HGF W507-L585 humana disposta dentro da sequência de HGF de camundongo.

[000132] Os seguintes construtos de expressão foram gerados

usando técnicas moleculares usuais e as sequências de cDNA resultantes foram confirmadas por sequenciamento de DNA:

a. hHGF-Fc

[000133] Em um primeiro ciclo de PCR, dois fragmentos de PCR sobreponíveis foram gerados introduzindo um sítio de Not I e codificando um sinalizador 6xHis entre hHGF e hlgFc. Os fragmentos de PCR sobreponíveis serviram como molde em um segundo ciclo para amplificar hHGF-his-IgFc. O fragmento resultante foi digerido por NheI e BamHI e clonado em pcDNA5/FRT (Invitrogen, #35-3014). Então, hHGF foi amplificado a partir do clone ID: IOH29794 (cDNA de HGF humano) da Invitrogen. A sequência correspondeu à sequência depositada no NCBI sob o número de acesso NM\_000601.4.

(1) Iniciador de NheI de hHGF5'

ACTGGCTAGCATGTGGGTGACCAAACCTCCT (SEQ ID NO. 102)

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

GTGATGGTGTGGTGTGGCGGCCGCATGACTGTGGTACCTTATATG (SEQ ID NO. 103)

(3) Iniciador de HisIgFc 5'

ACTGGCGGCCGCATCACCATCACCATCAC (SEQ ID NO. 104)

(4) Iniciador de BamHI de IgFc 3'

ACTGGGATCCTCACTATTTACCCGGGGACAG (SEQ ID NO. 105)

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

[000134] Os mutantes de hHGF-Fc, G555E e C561R, foram gerados por mutagênese sítio-dirigida usando o kit de mutagênese sítio-dirigida QuikChange II XL (Stratagene) de acordo com as instruções do fabricante.

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

CATGATGTCCACGAAAGAGGAGATGAG (SEQ ID NO. 106)

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

CTCATCTCCTCTTTCGTGGACATCATG (SEQ ID NO. 107)

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

GGAAGAGGAGATGAGAAACGCAAACAGGTTCTCAATG (SEQ ID NO. 108)

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

CATTGAGAACCTGTTTGC GTTTCTCATCTCCTCTTCC (SEQ ID NO. 109)

c. Fc quimérico camundongo-humano-camundongo

[000135] O construto de IgFc quimérico camundongo-humano-camundongo contém uma cadeia-alfa de mHGF, aminoácidos da cadeia  $\beta$  Val 495-Leu 585 de HGF humano, e a cadeia beta C-terminal de mHGF seguido por sinalizador 6xHis e IgG-Fc.

[000136] cDNA de HGF humano que codifica os aminoácidos V495-L585 foi amplificado a partir do clone ID: IOH29794 (cDNA de HGF humano) da Invitrogen. A sequência corresponde à sequência depositada no NCBI sob o número de acesso NM\_000601.4. Sequências de HGF de camundongo foram amplificadas por RT-PCR a partir de RNA total de fígado de camundongo (Clontech, # 636603) usando o kit de RT-PCR Super Script One Step da Invitrogen (#10928-034) de acordo com as instruções do fabricante. A sequência de cDNA de mHGF corresponde à sequência depositada no NCBI sob o número de acesso D10213.1.

[000137] Três fragmentos, referidos como 1, 2 e 3 foram gerados usando iniciadores de PCR sobreponíveis e anelados em ciclos consecutivos de amplificação por PCR. O produto final foi clivado com NheI e NotI e clonado em pcDNA5/FRT IgGFc.

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

5'ATCGGCTAGCATGATGTGGGGGACCAAAC (SEQ ID NO. 110)

3' GAATCCCATTTACAACCCGCAGTTGTTTTGTTTTGG (SEQ ID NO. 111)

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

hHGF

5' CCAAACAAAACAACACTGCGGGTTGTAAATGGGATTC (SEQ ID NO. 112)

3' CAGGATTGCAGGTCGAGCAAGCTTCATTAACCAGATCT (SEQ ID NO. 113)

(3) Iniciadores do fragmento 3 para NotI3' C-terminal da cadeia beta de mHGF

5' AGATCTGGTTTTAATGAAGCTTGCTCGACCTGCAATCCTG (SEQ ID NO. 114)

3'

GTAATTTTGACATACAAGTTGTGCGGCCGCCATCACCATCACCATCA C (SEQ ID NO. 115)

d. Construção de quimeras de hHGF e mhm

[000138] Os vetores que codificam as quimeras de hHGF e mhm (V495-L585), pcDNA5/FRT hHGF e quimera pcDNA5/FRT-mhm (V495-L585), sem Fc-tag foram gerados por mutagênese sítio-dirigida. Um códon de parada foi introduzido a 3' de 6xHis usando o kit de mutagênese sítio-dirigida QuikChange II XL (Stratagene) de acordo com as instruções do fabricante. Os iniciadores da mutagênese incluíram o iniciador 1:

CATCACCATCACCATCACTAAGCGGGTCTGGTGCCACG (SEQ ID NO. 116), e o Iniciador 2:

CGTGCCACAGACCCGCTTAGTGATGGTGATGGTGATG (SEQ ID NO. 117).

[000139] Além disso, duas quimeras de mhm adicionais foram criadas a partir do construto de pcDNA5/FRT-mhm (V495-L585) por mutagênese sítio-dirigida usando o kit de mutagênese sítio-dirigida QuikChange II XL (Stratagene) de acordo com as instruções do fabricante. Um construto de mhm continha a região de I499-R556 de hHGF disposta entre as sequências murinas. O outro construto de

mhm continha a região de W507-L585 de hHGF disposta entre as sequências murinas.

[000140] Para a quimera de mhm (I499-R556), as seguintes mutações pontuais foram feitas em ordem no construto molde da quimera pcDNA5/FRT-mhm (V495-L585): D558E, C561R, V564I, V567I e M583L, usando as sequências de oligonucleotídeo apropriadas. Para a quimera de mhm (W507-L585), as seguintes mutações pontuais foram introduzidas em uma etapa na quimera molde pcDNA5/FRT-mhm (V495-L585): Q502R, N504T e I505V, usando as sequências de oligonucleotídeo apropriadas.

[000141] A sequência de nucleotídeo resultante da proteína hHGF-Fc é descrita como SEQ ID NO. 118, incluindo a sequência de sinal (nucleotídeos 1-93) e pró-domínio (nucleotídeos 94 a 162). A sequência de aminoácido da proteína hHGF-Fc é descrita como SEQ ID NO. 119.

[000142] A sequência de nucleotídeo resultante que codifica a proteína mhm (V495-L585)-Fc quimérica é descrita em SEQ ID NO. 120, incluindo a sequência de sinal (nucleotídeos 1 a 96) e o pró-domínio (nucleotídeos 97 a 165). A sequência de aminoácido da proteína quimérica mhm (V495-L585)-Fc é descrita em SEQ ID NO. 121.

[000143] A sequência de nucleotídeo resultante que codifica e a sequência de proteína que define o construto de mhm (V495-L585) são descritas em SEQ ID NOS. 211 e 212, respectivamente. A sequência de ácido nucléico descrita em SEQ ID NO. 211 inclui a sequência de sinal (nucleotídeos 1 a 96) e o pró-domínio (nucleotídeos 97 a 165), e a sequência de proteína descrita em SEQ ID NO. 212 inclui a sequência de proteína ativa (sem a sequência de sinal ou o pró-domínio). A sequência de nucleotídeo resultante que codifica e a sequência de proteína que define o construto de mhm (I499-R556) são

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

#### e. Expressão de Proteína

##### (1) Cultura celular

[000144] Células CHO FlpIn (Invitrogen, N° de catálogo R758-07)) foram cultivadas em meio F12K (ATCC, N° de catálogo 30-2004), 10% de FCS (Invitrogen, N° de catálogo 10438026), 1% de Penicilina (10000 unidades/mL)/ estreptomicina (10.000 µg/mL) (Invitrogen, N° de catálogo 15140-122) a 37°C, 5% de CO<sub>2</sub>, 100 µg/mL de Zeocina (Invitrogen, N° de catálogo R250-01).

##### (2) Geração de Linhagens Celulares CHO estáveis

[000145] As células hospedeiras CHO FlpIn foram transfectadas com uma proporção 9:1 de DNA de plasmídeo de expressão pOG44:pcDNA5/FRT usando lipofectamina 2000 de acordo com as instruções do fabricante (Invitrogen, N° de catálogo 11668-027). Como controles, as células foram transfectadas com o vetor vazio pcDNA5/FRT vetor/pOG44 e plasmídeo pOG44 (Invitrogen, N° de catálogo 35-3018) apenas. Vinte e quatro horas após a transfecção, as células foram repicadas, e após quarenta e oito horas 0,5 mg/mL de Higromicina B (Sigma, N° de catálogo H0654-SPEC) foi adicionado às

células. A seleção policlonal de células estáveis foi realizada em F12K, 10% de FCS, 1% de Penicilina/Estreptomicina, 0,5 mg/mL de Higromicina B.

(3) Expressão de proteína em linhagens celulares CHO FlpIn estáveis [000146] Aproximadamente  $2 \times 10^6$  células foram semeadas em placas de 15 cm e cultivadas em F12K (ATCC, N° de catálogo 30-2004)/DMEM com alto teor de glicose (Invitrogen, N° de catálogo 11995065) 1:1, 5% de *ultra low* IgG FCS (Invitrogen, #16250-78) a 37°C, 5% de CO<sub>2</sub> por 5 a 6 dias. Os sobrenadantes foram colhidos e as proteínas resultantes analisadas por ELISA e por ressonância de plásmon de superfície.

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

[000147] Os anticorpos monoclonais produzidos no Exemplo 1 foram caracterizados por sua habilidade de se ligar a hHGF, e algumas das proteínas HGF recombinantes produzidas no Exemplo 3.

[000148] Os anticorpos foram analisados por ressonância de plásmon de superfície usando um instrumento BIAcore T100 para avaliar sua habilidade de se ligar a HGF e algumas das proteínas de fusão discutidas no Exemplo 3. Cada anticorpo foi imobilizado sobre um chip sensor CM5 de dextrano carboxilado (BIAcore, N° de catálogo BR-1006-68) por acoplamento de amina (BIAcore, N° de catálogo BR-1000-50) usando um protocolo de acoplamento usual de acordo com as instruções do fabricante.

[000149] As análises foram realizadas a 25°C usando PBS (GIBCO, N° de catálogo 14040-133) contendo 0,05% de tensoativo P20 (BIAcore, N° de catálogo R-1000-54), 2 mg/mL de BSA (EMD, N° de catálogo 2930) e 10 mg/mL de Sal de Sódio CM-Dextran (Fluka, N° de catálogo 86524) como tampão de corrida. Sobrenadantes contendo diferentes proteínas de fusão de HGF ou sobrenadante de células

transfectadas com o vetor vazio foram injetados sobre cada anticorpo em uma taxa de fluxo de 30  $\mu$ L/min por 3 minutos. A ligação resultante foi determinada como unidades de ressonância (RU) sobre o basal 30 segundos após o final da injeção. A ligação foi comparada com HGF humano (R&D Systems, N° de catálogo 294-HGN-025) diluído em tampão de corrida. Ligação inespecífica foi monitorada por comparar a ligação a uma superfície de controle onde IgG de camundongo (Rockland, N° de catálogo 010-0102) foi imobilizada usando o mesmo procedimento de acoplamento de amina.

[000150] Os resultados estão resumidos na Tabela 3.

**TABELA 3**

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

[000151] Os resultados na Tabela 3 demonstram que cada um dos anticorpos se liga a rhHGF e HGF humano purificado. Além disso, todos os anticorpos se ligam a hHGF contendo as mutações pontuais G555E e C561R. Em geral, todos os anticorpos exceto 1F3 e 2F8 não se ligam a murino demonstrando que os anticorpos 1A3, 1D3, 2B8, 3A12, 3B6, e 3D11 se ligam especificamente a HGF humano. Os anticorpos 1D3, 1F3, e 2B8 se ligam à quimera de camundongo-humano-camundongo, enquanto que os anticorpos restantes não se ligaram. Os resultados sugerem que os anticorpos 1D3 e 2B8 se ligam pelo menos em parte aos resíduos 495 a 585 de HGF humano. Os anticorpos 1A3, 3A12, 3B6, e 3D11 parecem se ligar a porções de hHGF humano com exceção dos resíduos 495 a 585. No momento é



não se sabe o motivo de 2F8 não se ligar à quimera de mhm já que ele parece se ligar tanto a hHGF quanto mHGF.

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

[000152] Neste Exemplo, os anticorpos monoclonais anti-hHGF produzidos no Exemplo 1 foram analisados quanto a sua habilidade de se ligar a HGF reduzido e não reduzido.

[000153] A reatividade dos soros anti-HGF com o hHGF recombinante foi avaliada por *immunoblotting*. Oito µg de proteína hHGF recombinante em tampão de corrida NuPAGE MOPS SDS (Invitrogen) com ou sem tampão redutor de amostra NuPAGE (Invitrogen) foram fracionados em um gel de Bis-Tris 4 a 12% com cavidades de 1,0mm X 2D (Invitrogen, Carlsbad, CA). As proteínas fracionadas foram então transferidas para uma membrana de nitrocelulose usando procedimentos usuais. As membranas de nitrocelulose foram bloqueadas com solução de leite em pó desnatado a 5% em Salina Tamponada com Tris com 0,1% de Tween-20® (TBST), e então colocadas em um equipamento Mini Protean II Multi-Screen (BioRad) para bloqueio adicional.

[000154] As membranas resultantes foram marcadas com os anticorpos purificados em um equipamento Multi-Screen. Os anticorpos purificados foram diluídos para 5 µg/mL em tampão de bloqueio. A membrana de nitrocelulose foi então removida do equipamento, e incubada com anticorpos anti-IgG de camundongo marcada com peroxidase de rábano silvestre. Os resultados estão resumidos na Tabela 4, onde os números refletem a extensão de ligação com – representando a ligação mínima (pouca ou nenhuma ligação) e 3+ representando a ligação máxima.

**TABELA 4**

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

[000155] Os dados na Tabela 4 demonstram que todos os anticorpos se ligam a rhHGF não-reduzido. Em oposição, os anticorpos monoclonais 1A3, 1D3, 1F3, 2F8, 3B6 se ligaram a rhHGF reduzido mas os anticorpos 2B8, 3A12, e 3D11 não se ligaram a rhHGF.

#### Exemplo 6 – Afinidades de Ligação

[000156] As afinidades de ligação e cinéticas de interação de cada um dos anticorpos produzidos no Exemplo 1 contra hHGF foram medidas por ressonância de plásmon de superfície.

[000157] Imunoglobulinas de coelho anti-camundongo (BIAcore, N° de catálogo BR-1005-14) foram imobilizadas sobre chips sensores CM5 de dextran carboxilado (BIAcore, N° de catálogo BR-1006-68) por acoplamento de amina (BIAcore, N° de catálogo BR-1000-50) usando um protocolo usual de acordo com as instruções do fabricante. As análises foram realizadas a 25°C usando PBS (GIBCO, N° de catálogo 14040-133) contendo 0,05% de tensoativo P20 (BIAcore, N° de catálogo BR-1000-54), 2 mg/mL de BSA (EMD, N° de catálogo 2930), e 10 mg/mL de Sal de Sódio CM-Dextran (Fluka, N° de catálogo 86524) como tampão de corrida.

[000158] Os anticorpos foram capturados em uma célula de fluxo individual em uma taxa de fluxo de 10 µL/min. O tempo de injeção foi variável para cada anticorpo para produzir aproximadamente 20 RU de anticorpo capturado para cada ciclo. Tampão ou HGF (R&D Systems, N° de catálogo 294-HGN-025) diluído em tampão de corrida foi

injetado sequencialmente sobre uma superfície de referência (nenhum anticorpo capturado) e sobre a superfície ativa (anticorpo a ser testado) por 2 minutos a 60  $\mu\text{L}/\text{min}$ . A fase de dissociação foi monitorada por 15 ou 90 minutos, dependendo da concentração. A superfície foi então regenerada com 10 mM de Glicina-HCl, pH 1,7 (BIAcore, N<sup>o</sup> de catálogo BR-1003-54) injetada por 3 minutos em uma taxa de fluxo de 60  $\mu\text{L}/\text{min}$  antes de outro ciclo ser iniciado. As concentrações de HGF testadas foram 0,46 nM a 7,5 nM.

[000159] Os parâmetros de cinética foram determinados usando a função de cinética do programa BIAevaluation com subtração da referência. Os parâmetros de cinética para cada anticorpo  $k_a$  (constante da taxa de associação),  $k_d$  (constante da taxa de dissociação) e  $K_D$  (constante de dissociação de equilíbrio) estão resumidos na Tabela 5.

**TABELA 5**

Anticorpo	$k_a$ (1/Ms)	SE ( $k_a$ )	$k_d$ (1/s)	SE ( $k_d$ )	$K_D$ (pM)	SD
1A3	$1,7 \times 10^6$	$7,3 \times 10^4$	$5,2 \times 10^{-5}$	$8,4 \times 10^{-7}$	30,1	5,6
1D3	$1,7 \times 10^6$	$3,1 \times 10^4$	$8,2 \times 10^{-5}$	$1,7 \times 10^{-6}$	54,2	27,4
1F3	$1,5 \times 10^6$	$5,0 \times 10^4$	$2,6 \times 10^{-5}$	$6,6 \times 10^{-7}$	18,1	8,2
2B8	$1,6 \times 10^6$	$2,9 \times 10^4$	$2,1 \times 10^{-5}$	$1,4 \times 10^{-7}$	13,5	4,4
3A12	$1,6 \times 10^6$	$3,7 \times 10^4$	$1,6 \times 10^{-4}$	$1,6 \times 10^{-6}$	103,0	10,4
3B6	$2,0 \times 10^6$	$6,5 \times 10^4$	$3,9 \times 10^{-5}$	$3,2 \times 10^{-7}$	17,0	3,4

[000160] Os dados na Tabela 5 demonstram que os anticorpos se ligam a hHGF com um  $K_D$  de cerca de 100 pM ou menos, cerca de 50 pM ou menos, ou 20 pM ou menos.

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

[000161] Neste exemplo, os anticorpos produzidos no Exemplo 1 foram caracterizados quanto a sua habilidade de (a) inibir a ligação de hHGF a c-Met, e (b) inibir a incorporação de BrdU estimulada por HGF em células 4MBr-5.

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

[000162] Os anticorpos foram testados por ELISA quanto a sua

habilidade de inibir a ligação de hHGF a c-Met.

[000163] Especificamente, placas de ensaio DELFIA de 96 cavidades Wallac (Wallac Inc., N° de catálogo AAAND-0001) foram revestidas com 100 µL de HGF a 6,25 µg/mL (R&D Systems, N° de catálogo 294-HGN-025) em tampão de revestimento de carbonato (15 mM de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> e 34 mM de NaHCO<sub>3</sub>, pH 9,0) por 16 horas a 4°C. As placas foram então bloqueadas com 200 µL de leite em pó desnatado a 5% em PBS por 1 hora em temperatura ambiente. Os anticorpos foram preparados em uma placa separada por adicionar concentrações crescentes dos anticorpos sob investigação (0,033 a 667 nM, diluição seriada de 3 vezes) a 2 nM de c-Met (R&D Systems, N° de catálogo 358-MT/CF) em leite em pó desnatado a 5% em PBS. 100 µL de amostra por cavidade foram transferidos para a placa de ensaio e incubados durante a noite a 4°C. As placas de ensaio foram então lavadas três vezes com PBS-0,1% de Tween 20, e incubados por 2 horas em temperatura ambiente com 100 µL/cavidade de anticorpo anti-c-Met humano biotilado a 2 µg/mL (R&D Systems, N° de catálogo BAF358) preparado em leite em pó desnatado a 5% em PBS.

[000164] As placas resultantes foram então lavadas três vezes com PBS-0,1% de Tween 20, e incubadas por 1 hora a temperatura ambiente com Estreptavidina marcada com Eu (Wallac, N° de catálogo 1244-360) diluída 1:1000 em tampão de ensaio DELFIA (Wallac, N° de catálogo 4002-0010). As placas resultantes foram lavadas 3 vezes com solução de lavagem DELFIA (Wallac, N° de catálogo 4010-0010) e incubadas com 100 µL/cavidade de solução de intensificação DELFIA (Wallac #4001-0010) por 15 minutos em temperatura ambiente com agitação.

[000165] As placas foram lidas em um instrumento Victor<sup>3</sup>V (Perkin Elmer) usando o método de Európio. Os valores de IC<sub>50</sub> foram

calculados e estão resumidos na Tabela 6.

**TABELA 6**

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

[000166] Os resultados demonstram que todos os anticorpos (isto é, 1D3, 1A3, 2B8, 3A12, 1F3, 3D11, e 2F8) com exceção de 3B6 neutralizam eficazmente a ligação de HGF a c-Met.

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

[000167] Dez  $\mu\text{L}$  de 12,5 nM de hHGF foram dispensados em cavidades individuais de uma placa de microtitulação de cultura de tecido de 96 cavidades (Costar, N<sup>o</sup> de catálogo 3903). Dez  $\mu\text{L}$  de anticorpos foram diluídos seriadamente em concentrações de 6667; 2222; 740; 247; 82; 27; 9,1; 3,0; 1,0; 0,33 nM foram adicionados a cada cavidade. A mistura de anticorpo de HGF foi então incubada em temperatura ambiente por 30 minutos. Células epiteliais brônquicas de macaco 4MBr-5 (ATCC, CCL208) cultivadas em F-12K (ATCC, 30-2004), 15% de FBS (Gibco 10438-026), 30 ng/mL de EGF (Sigma E9644), 1% de penicilina/estreptomicina (PS, Gibco N<sup>o</sup> de catálogo 15140-122) foram dissociadas com Tripsina (Gibco, N<sup>o</sup> de catálogo 25200-056), ressuspensas em meio de ensaio (F-12K, 2,5% de FBS, 1% de PS) a 75.000 células/mL, e 80  $\mu\text{L}$  da suspensão celular foi dispensada à mistura de anticorpo de HGF.

[000168] As células resultantes foram incubadas a 37°C, 5% de CO<sub>2</sub>. Quarenta e oito horas depois, 10  $\mu\text{L}$  de BrdU a 100  $\mu\text{M}$  (Roche, N<sup>o</sup> de catálogo 1669915) foram adicionados. Setenta e duas horas depois, o meio foi removido, as placas foram secas com secador de cabelo e

foram processadas com ELISA de BrdU de acordo com as instruções do fabricante (Roche N° de catálogo 1669915).

[000169] O sinal luminescente foi quantificado por um leitor de placas Synergy HT (Bio-Tek). Os dados foram ajustados para uma dose-resposta sigmóide com inclinação variável com a equação  $y = inferior + (superior - inferior) / (1 + 10^{-(\log(EC50 - x) * inclinação)})$  em GraphPad Prism (GraphPad Software). Cada experimento foi repetido pelo menos 3 vezes em duplicatas e os valores de EC<sub>50</sub> médios são apresentados na Tabela 7.

TABELA 7

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

[000170] Os resultados na Tabela 7 demonstram que todos os anticorpos 1A3, 1D3, 1F3, 2B8, 2F8, 3A12, 3B6, e 3D11 inibem a proliferação induzida por HGF em células 4MBr-5.

Exemplo 8 - Atividade Antidispersão de Anticorpos Anti-hHGF

[000171] Este Exemplo descreve uma caracterização dos anticorpos produzidos no Exemplo 1 quanto a sua habilidade de inibir a atividade de dispersão induzida por HGF. HGF induz "dispersão" (motilidade) de aglomerados em células MDCK (ATCC, Manassas, VA, N° de catálogo CCL-34).

[000172] Células MDCK foram semeadas em placas de cultura de tecido de 96 cavidades Costar (Corning Incorporated, Corning, NY, N° de catálogo 3595) em uma densidade de  $4 \times 10^3$  células por cavidade em 80  $\mu$ L de MEM (ATCC, Manassas, VA, N° de catálogo 30-2003) contendo 10% de Soro Fetal Bovino (Invitrogen N° de catálogo 10438026), e 1% de penicilina-estreptomcina (Invitrogen, N° de

catálogo 15140122). Cada um dos anticorpos a ser investigado foi diluído para 6.667 nM em MEM contendo 10% de Soro Fetal Bovino e 1% de penicilina-estreptomicina. Cada uma das diferentes diluições de anticorpo, assim como MEM contendo 10% de Soro Fetal Bovino e 1% de penicilina-estreptomicina sem anticorpo, foi então combinada separadamente com um volume igual de MEM contendo 10% de Soro Fetal Bovino e 1% de penicilina-estreptomicina, e 100 ng/ml de HGF (R&D Systems N° de catálogo 294-HGN-025). As diluições de anticorpo/HGF foram incubadas por 30 minutos a 25°C. Vinte µL de cada diluição de anticorpo/HGF foi adicionada separadamente à cavidades individuais, gerando uma concentração final de anticorpo de 666,7 nM, e uma concentração final de HGF de 10 ng/ml. As células MDCK foram então incubadas por 24 horas a 37°C com 5% de CO<sub>2</sub>.

[000173] Após 24 horas de incubação, as células MDCK foram cuidadosamente lavadas uma vez com 100 µL por cavidade de PBS gelado (Invitrogen N° de catálogo 14190144), e fixadas com 100 µL por cavidade de metanol gelado durante agitação por 10 minutos a 25°C. As placas foram então lavadas cuidadosamente uma vez com água destilada. Um volume de 100 µL de solução de cristal violeta, consistindo em 0,5% de cristal violeta (Sigma, St. Louis, MO, N° de catálogo C3886) e etanol a 50% em água destilada, foi adicionado a cada cavidade, e as células foram incubadas por 20 minutos a 25°C com agitação.

[000174] Após a marcação com solução de cristal violeta, as células foram lavadas cuidadosamente três vezes com água destilada. A seguir, PBS foi adicionado a cada cavidade para evitar o ressecamento das amostras. As células foram visualizadas usando o microscópio Leica DMIRB (Leica Microsystems GmbH, Wetzler, Alemanha), a câmera DC500 (Leica Microsystems GmbH, Wetzler, Germany), e o programa MagnaFire 2.1C (Optronics, Goleta, CA), e as

amostras foram quantificadas quanto ao nível de dispersão. Os resultados estão resumidos na Tabela 8.

**TABELA 8**

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

- Nenhuma inibição

+++ Inibição muito grande, quase completa

++ Inibição forte

+ Inibição detectável

[000175] Os resultados na Tabela 8 demonstram que o anticorpo 2B8 inibiu a dispersão induzida por HGF mais do que os outros anticorpos. Os anticorpos 1D3 e 3B6 apresentaram um nível de inibição intermediário; o anticorpo 1A3 apresentou um nível de inibição baixo a intermediário. Os anticorpos 1F3 e 2F8 apresentaram um nível de inibição baixo; e os anticorpos 3A12 e 3D11 forneceram pouca ou nenhuma inibição detectável.

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

[000176] Este Exemplo descreve uma caracterização dos anticorpos produzidos no Exemplo 1 quanto a sua habilidade de inibir a fosforilação de c-Met estimulada por HGF em células PC-3. HGF induz a fosforilação de Met em células PC-3 (ATCC No. CRL-1435).

[000177] As células PC-3 foram semeadas em cavidades individuais de placas de cultura de tecido de 96 cavidades Costar (Corning N° de catálogo 3595) em uma densidade de  $4,5 \times 10^4$  células por cavidade em 100  $\mu$ L de F-12K (ATCC, Manassas, VA, N° de catálogo 30-2004) contendo 10% de Soro Fetal Bovino (Invitrogen, N° de catálogo



10438026) e 1% de penicilina-estreptomicina (Invitrogen, N° de catálogo 15140122). Após 24 horas a 37°C com 5% de CO<sub>2</sub>, o meio foi removido, e as células foram enxaguadas uma vez com F-12K sem soro contendo 1% de penicilina-estreptomicina. As células foram então incubadas por 24 horas em 100 µL de F-12K sem soro contendo 1% de penicilina-estreptomicina.

[000178] As 10 diferentes diluições a seguir de cada um dos anticorpos sendo investigados foram preparadas em F-12K sem soro contendo 1% de penicilina-estreptomicina: 6667 nM, 2222 nM, 741 nM; 247 nM; 82,3 nM; 27,4 nM; 9,1 nM; 3,0 nM; 1,0 nM; e 0,3 nM. Cada diluição de anticorpo, e F-12K sem soro contendo 1% de penicilina-estreptomicina sem anticorpo, foram combinadas separadamente com um volume igual de F-12K sem soro contendo 1% de penicilina-estreptomicina e 500 ng/mL de HGF (R&D Systems N° de catálogo 294-HGN-025). Estas diluições de anticorpo/HGF foram incubadas por 30 minutos a 25°C. Isto resultou em uma concentração final de 1,25 nM de HGF.

[000179] As células PC-3 foram lavadas uma vez com F-12K sem soro contendo 1% de penicilina-estreptomicina. A seguir, 70 µL de F-12K sem soro contendo 1% de penicilina-estreptomicina foi adicionado às células, seguido por 10 µL de Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub> a 10 mM (Sigma, N° de catálogo S6508) em F-12K sem soro contendo 1% de penicilina-estreptomicina. As células foram então incubadas por 60 minutos a 37°C com 5% de CO<sub>2</sub>. Após esta incubação, 20 µL de cada diluição de anticorpo/HGF foi adicionada aos separadamente a cavidades separados, produzindo uma concentração final de HGF de 50 ng/mL, e as seguintes concentrações finais de cada anticorpo 666,7 nM; 222,2 nM; 74,1 nM; 24,7 nM; 8,23 nM; 2,74 nM; 0,91 nM; 0,30 nM; 0,10 nM; 0,03 nM. As células foram então incubadas por 10 minutos a 37°C com 5% de CO<sub>2</sub>, e após isto, a mistura de meio/anticorpo/HGF foi

removida, as placas foram plaqueadas em gelo. As células foram então lavadas uma vez com 100 µL por cavidade de PBS gelado (Invitrogen, N° de catálogo 14190144) contendo 1 mM de Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>. As células foram então incubadas por 30 minutos a 4°C em 100 µL por cavidade de tampão de lise gelado consistindo em 1% de OmniPur Triton X-100 (MERCK KGaA, Darmstadt, Alemanha, N° de catálogo 9410), 50 mM de Tris-HCl pH 8,0, 100 mM de NaCl, 0,3 mM de Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>, coquetel de inibidor de protease a 1x (Sigma, N° de catálogo P8340), e coquetel de inibidor de protease 2 a 1x (Sigma, N° de catálogo 5726).

[000180] Anticorpo anti-HGF-R humano biotilado (c-met) (R&D Systems, N° de catálogo BAF358) foi diluído para uma concentração de 2 µg/mL em tampão de ensaio DELFIA Assay Buffer (PerkinElmer, Turku, Finland, N° de catálogo 4002-0010) contendo 1% de albumina sérica bovina (Sigma N° de catálogo A2153), e 50 µL por cavidade desta diluição foram adicionados de placas de microtitulação de estreptavidina amarela (PerkinElmer, N° de catálogo AAAND-0005). As placas foram então incubadas com anticorpo por 30 minutos a 25°C com agitação. Após a incubação, as placas foram lavadas com solução de lavagem DELFIA (PerkinElmer, N° de catálogo 4010-0010), e 80 µL de cada um dos diferentes lisados de células PC-3 foram adicionados a cavidades individuais das placas de microtitulação de estreptavidina lavadas.

[000181] As placas de microtitulação de estreptavidina contendo lisados de células PC-3 foram incubadas por 60 minutos a 25°C com agitação, e então lavadas com solução de lavagem DELFIA. 100 µL de 600 ng/mL de anticorpo DELFIA Eu-N1 P-Tyr-100 (PerkinElmer, N° de catálogo AD0159) diluído em DELFIA Assay Buffer contendo 1% de albumina sérica bovina foi adicionada a cada cavidade das placas de microtitulação de estreptavidina lavadas incubadas previamente com

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

[000182] O sinal foi então medido usando o protocolo de Európio no leitor Victor3V (PerkinElmer). Os valores de EC<sub>50</sub> foram calculados usando Prism 4 para Windows (GraphPad Software, Inc., San Diego, CA) e a equação dose-resposta sigmóide.

[000183] Os resultados resumidos como EC50s em nM estão tabulados na Tabela 9.

**TABELA 9**

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

[000184] Os dados na Tabela 9 demonstram que todos os oito anticorpos são potentes inibidores da fosforilação de c-Met induzida por HGF em células PC-3.

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

[000185] A habilidade de anticorpos monoclonais murinos da invenção inibirem o crescimento tumoral foi testada em um modelo de xenoenxerto de U87MG. Células U87MG (ATCC) foram expandidas em cultura a 37°C em uma atmosfera contendo 5% de CO<sub>2</sub> e 95% de ar, usando um meio que compreende meio de Eagle Modificado por Dulbecco (DMEM) com 10% de soro fetal bovino, 100 unidades/mL de

penicilina e 100 µg/mL de estreptomicina. As células foram subcultivadas e mantidas por desprender as células da parede da placa de cultura usando tripsina-EDTA.

[000186] Células quase confluentes foram coletadas por tripsinização e então  $5 \times 10^6$  células em Matrigel 50% (BD Biosciences; N° de catálogo 356237) foram injetadas subcutaneamente na área dorsal superior entre a escápula de camundongos ICR SCID fêmeas de 7 semanas de idade (Taconic Labs). Os diâmetros (mm) mais longos (L) e mais curtos (W) dos tumores foram medidos com um compasso de calibre. O volume tumoral (vol) foi calculado como:  $(\text{mm}^3) = L \times W^2 / 2$ . Quando os tumores cresceram para aproximadamente 200 mm<sup>3</sup>, os camundongos que possuíam os tumores foram randomizados em 5 grupos de 10 camundongos cada. Um grupo recebeu PBS. Cada um dos outros 4 grupos recebeu um dos anticorpos 1A3, 1D3, 1F3 ou 2B8. Todos os anticorpos foram administrados em doses de 1 mg/kg de peso corporal, duas vezes por semana, por injeções intraperitoneais de 5 doses. Os volumes tumorais e os pesos corporais dos camundongos foram registrados duas vezes por semana. A inibição do crescimento tumoral foi analisada usando o teste de *t*-Student. Os resultados estão resumidos na Figura 6 e na Tabela 10.

**TABELA 10**

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

[000187] Regressão parcial foi obtida no grupo tratado com 2B8 (Figura 6). Inibição estatisticamente significativa do crescimento foi observada nos grupos tratados com 1A3 e nos tratados com 1F3 (Tabela 10). Houve uma inibição de crescimento do tumor de 51% para 1D3 com um valor de p de 0,075. Nenhuma perda corporal significativa foi observada.

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

[000188] A habilidade dos anticorpos 1A3, 1D3, 1F3 e 2B8 em inibir o crescimento tumoral foi testado em um modelo de xenoenxerto de U118. Células U118 (ATCC) foram expandidas como descrito no Exemplo 10 (acima) com relação às células U87MG.

[000189] Tumores subcutâneos foram estabelecidos como descrito no Exemplo 10 acima, exceto que os camundongos usados eram camundongos nude NCr fêmeas de 7 semanas de idade (Taconic), e o tratamento foi iniciado quando os tumores atingiram aproximadamente 80 mm<sup>3</sup>. Como no modelo de U87MG, todos os anticorpos foram administrados em doses de 1 mg/kg de peso corporal duas vezes por semana por injeções intraperitoneais por 4 doses. Os volumes tumorais e os pesos corporais dos camundongos foram registrados duas vezes por semana. A inibição do crescimento do tumor foi analisada usando o teste de *t*-Student. Os resultados estão resumidos na Figura 7 e na Tabela 11.

Tabela 11

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

[000190] Inibição do tumor estatisticamente significativa foi observada nos grupos tratados com 2B8 e 1A3 (Figura 7). Houve uma modesta inibição do crescimento do tumor nos grupos de 1F3 e 1D3 com valores de p menores do que 0,05, o qual foi definido como significância estatística neste estudo (Tabela 11). Nenhuma perda de peso corporal significativa foi observada.

### Exemplo 12 – Humanização de Anticorpos Monoclonais Murinos

[000191] Este Exemplo descreve a humanização do anticorpo murino 2B8, junto com uma caracterização dos anticorpos humanizados resultantes, as regiões Variáveis de Cadeia Pesada e Leve de 2B8

foram "humanizadas" por dois métodos.

#### A. Procedimento de Humanização 1

[000192] No primeiro método, três regiões variáveis de cadeia pesada humanizadas e duas regiões variáveis de cadeia leve humanizadas foram desenhadas com base no método de "super-humanização" descrito em Hwang *et al.* (2005) METHODS 36:35-42; Tan *et al.* (2002) J. IMMUNOL. 169:1119-1125; Patente US 6.881,557.

[000193] A classe estrutural canônica de Chothia foi determinada para cada CDR de 2B8 de camundongo com base o comprimento e na composição de aminoácidos da CDR. As regiões variáveis de linhagem germinativa humanas que consistem em regiões variáveis leves e pesadas da mesma classe estrutural canônica de Chothia foram identificadas com base em alelos de referência da região variável de linhagem germinativa humana conhecidos descritos no site da internet do International Immunogenetics Information System (IMGT) (disponível na rede de alcance mundial em [imgt.cines.fr](http://imgt.cines.fr) e [biochem.unizh.ch/antibody/Sequences/index.html](http://biochem.unizh.ch/antibody/Sequences/index.html)). Estas regiões variáveis de linhagem germinativa humana da mesma classe estrutural foram comparadas a regiões variáveis de 2B8 de murino por calcular o percentual de identidade ou similaridade entre os resíduos de aminoácido da CDR. As regiões variáveis de linhagem germinativa humanas com a maior identidade e/ou similaridade com os resíduos da CDR de 2B8 de camundongo foram preservadas, enquanto que os resíduos da CDR de 2B8 foram usados para substituir os resíduos correspondentes da região variável de linhagem germinativa humana que eram diferentes entre as CDRs de linhagem germinativa humana e CDR de 2B8 de camundongo. A região J humana que era a mais semelhante à região J de camundongo de 2B8 foi então adicionada à terminação carboxila das regiões variáveis "super-humanizadas" e estas sequências de aminoácido foram convertidas em sequências de

ácido nucléico.

[000194] A sequência de ácido nucléico da região variável completa foi construída usando métodos de síntese de gene por PCR (Young *et al.* (2004) NUCL. ACIDS RES. 32:e59) e clonadas em um vetor de expressão em mamífero (baseado em pcDNA3.2 DEST (Invitrogen)) contendo regiões constantes humanas (a jusante das regiões variáveis) de IgG1 (alótipo G1m(17,1)) ou Capa (alótipo Km(3) (alelo 2)) usando técnicas de biologia molecular usuais. Todos os quatro anticorpos de IgG1 de cadeia pesada (de 2B8 quimérico a 3 cadeias pesadas humanizadas (Hu2B8 Hv1-f.1, Hu2B8 Hv5-a.1, Hu2B8 Hv5-51.1) foram expressos nas combinações possíveis com todos os 3 anticorpos de cadeia capa (quimera de 2B8 e 2 cadeias leves humanizadas (Hu2B8 Kv1-39.1 e Hu2B8 Kv3-15.1) criando 12 proteínas de anticorpo diferentes. A ligação dos anticorpos quiméricos, quiméricos/humanizados e humanizados a HGF humano foi então medida como descrito abaixo e os resultados estão resumidos na Figura 8. Cada uma das possíveis combinações de cadeia pesada de imunoglobulina e cadeia leve de imunoglobulina são descritas abaixo na Tabela 12A.

**Tabela 12A**

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

[000195] Cada uma das combinações possíveis das cadeias pesadas de imunoglobulina e cadeias leves de imunoglobulinas é descrita abaixo na Tabela 12B.

Tabela 12B

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

[000196] Dois dos possíveis construtos de anticorpo que contêm as cadeias pesadas e leves de imunoglobulina de extensão completa contendo as regiões variáveis humanizadas são designados abaixo.

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

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

[000197] As sequências de ácido nucléico codificantes e as sequências de proteína que definem cada um dos anticorpos humanizados estão resumidas abaixo. Nesta seção, o último nucleotídeo de cada região variável é a primeira base do próximo códon gerado pela junção da região variável/constante. Este nucleotídeo está incluído na Região Variável porque ele faz parte deste éxon. Sequências de aminoácido de Regiões Constantes



listadas abaixo incluem a tradução deste códon de junção.

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

```

      1  atgggatgga  gctatatcat  cctctttttg
gtagcaacag ctacagatgt ccactcccag
      61  gtccaactgc  agcagcctgg  ggctgaactg
gtgaagcctg ggacttcagt gaagctgtcc
     121  tgcaaggctt  ctggctacac  cttcaccacc
tactggatgc actgggtgaa tcagaggcct
     181  ggacaaggcc  ttgagtggat  tggagagatt
aatcctacca acggtcatac taactacaat
     241  gagaagttca  agagcaaggc  cacactgact
gtagacaaat cctccagcac agcctacatg
     301  caactcagca  gcctgacatc  tgaggactct
gcggtctatt actgtgcaag aaactatggt
     361  ggtagcatct  ttgactactg  gggccaaggc
accacttca  cgtctcctc  agcctccacc
     421  aagggcccat  cggctctccc  cctggcacc
tcctccaaga gcacctctgg gggcacagcg
     481  gccctgggct  gcctgggtcaa  ggactacttc
cccgaaccgg tgacgggtgtc gtggaactca
     541  ggcgcctga  ccagcggcgt  gcacaccttc
cgggtgtcc  tacagtctc  aggactctac
     601  tccctcagca  gcgtggtgac  cgtgcctcc
agcagcttg  gcaccagac  ctacatctgc
     661  aacgtgaatc  acaagcccag  caacaccaag
gtggacaaga aagttgagcc caatcttgt
     721  gacaaaactc  acacatgccc  accgtgcca
gcacctgaac tcctgggggg accgtcagtc

```

781      ttcctcttcc      ccccaaaacc      caaggacacc  
 ctcatgatct cccggacccc tgaggtcaca  
 841      tgcgtggtgg      tggacgtgag      ccacgaagac  
 cctgagggtca agttcaactg gtacgtggac  
 901      ggcgtggagg      tgcataatgc      caagacaaag  
 ccgcgggagg agcagtacaa cagcacgtac  
 961      cgtgtggtca      gcgtcctcac      cgtcctgcac  
 caggactggc tgaatggcaa ggagtacaag  
 1021     tgcaaggtct      ccaacaaagc      cctcccagcc  
 cccatcgaga aaaccatctc caaagccaaa  
 1081     gggcagcccc      gagaaccaca      ggtgtacacc  
 ctgcccccat cccgggatga gctgaccaag  
 1141     aaccaggtca      gcctgacctg      cctggtcaaa  
 ggcttctatc ccagcgacat cgccgtggag  
 1201     tgggagagca      atgggcagcc      ggagaacaac  
 tacaagacca cgctcccgt gctggactcc  
 1261     gacggctcct      tcttcctcta      cagcaagctc  
 accgtggaca agagcaggtg gcagcagggg  
 1321     aacgtcttct      catgctccgt      gatgcatgag  
 gctctgcaca accactacac gcagaagagc  
 1381 ctctccctgt ctccgggtaa atga

**(2) Sequência de Proteína que Define a Cadeia Pesada de 2B8 Quimérico de Extensão Completa (IgG1 de 2B8 Quimérico (alótipo G1m (17,1)) (sem sequência de sinal) (SEQ ID NO. 155)**

1      qvqlqqpgae      lvkpgtsvkl      sckasgytft  
 tywmhwnqr pggglewige inptnghtny  
 61      nefkskatl      tvdkssstay      mqlssltsed  
 savyycarny vgsifdywgq gttltvssas  
 121     tkgpsvfpla      psskstsggt      aalgclvkdy  
 fpepvtvswn sgaltsgvht fpavllqssgl  
 181     yslssvvtvp      ssslgtqtyi      cnvnhkpsnt

kvdkkvepks cdkthtcppc papellggps  
 241 vflfppkpkd tlmisrtpev tcvvvdvshe  
 dpevkfnwyv dgvevhnakt kpreeqynst  
 301 yrvvsvltvl hqdwlngkey kckvsnkalp  
 apiektiska kgqprepqvvy tlppsrdeft  
 361 knqvsltclv kgfypsdiav ewesngqpen  
 nykttppvld sdgsfflysk ltvdkstrwqq  
 421 gnvfscsvmh ealhnhytqk slslspgk

(3) Sequência de Ácido Nucléico que Codifica a Cadeia Leve de  
 Extensão Completa de 2B8 Quimérico (Região Variável de  
 Camundongo e Região Constante Humana) (Capa de 2B8 Quimérico  
 (Km(3))) (sequência de sinal sublinhada) (SEQ ID NO. 156)

1 atggaatcac agactctggt cttcatatcc  
atactgctct ggttatatgg tgctgatggg  
 61 aacattgtaa tgaccaatc tcccaaattc  
 atgtccatgt cagtaggaga gagggtcacc  
 121 ttgagctgca aggccagtga gaatgtggtt  
 tcttatgtat cctgggatca acagaaacca  
 181 ggcgagtctc ctaaactgct gatatacggg  
 gcatccaacc ggaacactgg ggtccccgat  
 241 cgcttcacag gcagtggatc tgcaacagat  
 ttcactctga ccatcagcag tgtgcgggct  
 301 gaagaccttg cagattatca ctgtgggcag  
 agttacaact atccgtacac gttcggaggg  
 361 gggaccaggc tggaaataaa acgaactgtg  
 gctgcaccat ctgtcttcat cttcccggca  
 421 tctgatgagc agttgaaatc tggaactgcc  
 tctgttgtgt gcctgctgaa taacttctat  
 481 cccagagagg ccaaagtaca gtggaagggtg  
 gataacgcc tccaatcggg taactcccag  
 541 gagagtgtca cagagcagga cagcaaggac

agcacctaca gcctcagcag caccctgacg  
 601 ctgagcaaag cagactacga gaaacacaaa  
 gtctacgcct gcgaagtcac ccatcagggc  
 661 ctgagctcgc ccgtcacaaa gagcttcaac  
 aggggagagt gttga

**(4) Sequência de Proteína que Define a Cadeia Leve de Extensão Completa de 2B8 Quimérico (Capa de 2B8 Quimérico (Km(3))) (sem sequência de sinal) (SEQ ID NO. 157)**

1 nivmtqspks msmsvgervt lsckasenvv  
 syvswyqqkp aqspklliyg asnrntgvpd  
 61 rftgsgsatd ftltissvra edladyhcgq  
 synpytfgg gtrleikrtv aapsvfifpp  
 121 sdeqlksgta svvcllnnfy preakvqwkv  
 dnalqsgnsq esvteqdskd styslsstlt  
 181 lskadyekhk vyacevthqg lsspvtksfn rgec

**(5) Sequência de Ácido Nucléico que Codifica a Região Variável da Cadeia Pesada de Hu2B8 Hv1-f.1 Humanizado (sequência de sinal sublinhada) (SEQ ID NO. 158)**

1 atggactgca cctggaggat cctcctcttg  
gtggcagcag ctacaggcac ccacgccgag  
 61 gtccagctgg tacagtctgg ggctgaggtg  
 aagaagcctg gggctacagt gaaaatctcc  
 121 tgcaaggttt ctggatacac cttcaccacc  
 tactggatgc actgggtgca acaggcccct  
 181 ggaaaagggc ttgagtggat gggagagatt  
 aatcctacca acggtcatac taactacaat  
 241 gagaagttcc agggcagagt caccataacc  
 gcggacacgt ctacagacac agcctacatg  
 301 gagctgagca gcctgagatc tgaggacacg  
 gccgtgtatt actgtgcaac aaactatggt  
 361 ggtagcatct ttgactactg gggccaagga

accctgggtca ccgtctcctc ag

**(6) Sequência de Proteína que Define a Região Variável da Cadeia Pesada de Hu2B8 Hv1-f.1 Humanizado (sem sequência de sinal) (SEQ ID NO. 159)**

1 evqlvqsgae vkkpgatvki sckvsgytft  
tywmhvwqqa pgkglewmge inptnghtny  
61 nekfggrvti tadtstdtay melsslrsed  
tavyycatny vgsifdywgq gtlvtvss

**(7) Sequência de Ácido Nucléico que Codifica a Região Constante da Cadeia Pesada de IgG1 Humana (alótipo G1m(17,1)) (SEQ ID NO. 160)**

1 cctccaccaa gggcccatcg gtcttcccc  
tggcaccctc ctccaagagc acctctgggg  
61 gcacagcggc cctgggctgc ctggtcaagg  
actacttccc cgaaccggtg acggtgtcgt  
121 ggaactcagg cgccctgacc agcggcgtgc  
acaccttccc ggctgtccta cagtcctcag  
181 gactctactc cctcagcagc gtggtgaccg  
tgccctccag cagcttgggc acccagacct  
241 acatctgcaa cgtgaatcac aagcccagca  
acaccaaggt ggacaagaaa gttgagccca  
301 aatcttgtga caaaactcac acatgcccac  
cgtgcccagc acctgaactc ctggggggac  
361 cgtcagtctt cctcttcccc ccaaaacca  
aggacaccct catgatctcc cggaccctg  
421 aggtcacatg cgtggtggtg gacgtgagcc  
acgaagacct tgaggtaag ttcaactggt  
481 acgtggacgg cgtggaggtg cataatgcca  
agacaaagcc gcgggaggag cagtacaaca  
541 gcacgtaccg tgtggtcagc gtcctcaccg  
tcctgcacca ggactggctg aatggcaagg

601 agtacaagtg caaggtctcc aacaaagccc  
 tcccagcccc catcgagaaa accatctcca  
 661 aagccaaagg gcagccccga gaaccacagg  
 tgtacaccct gccccatcc cgggatgagc  
 721 tgaccaagaa ccaggtcagc ctgacctgcc  
 tgggtcaaagg cttctatccc agcgacatcg  
 781 ccgtggagtg ggagagcaat gggcagccgg  
 agaacaacta caagaccacg cctcccgtgc  
 841 tggactccga cggctccttc ttctctaca  
 gcaagctcac cgtggacaag agcaggtggc  
 901 agcaggggaa cgtcttctca tgctccgtga  
 tgcattgagc tctgcacaac cactacacgc  
 961 agaagagcct ctccctgtct ccgggtaaat ga

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

1 astkgpsvfp lapsskstsg gtaalgclvk  
 dyfpepvtvs wnsгалtsgv htfpavllqss  
 61 glyslssvvt vpssslgtqt yicnvnhkps  
 ntkvdkkvep kscdkthtcp pcpapellgg  
 121 psvflfppkp kdtlmisrtp evtcvvdvs  
 hedpevkfnw yvdgvevhna ktkpreeqyn  
 181 styrvsvlt vlhqdwlngk eykckvsnka  
 lpapiektis kakgqprepq vytlppsrdc  
 241 ltknqvsltc lvkgfypsdi avewesngqp  
 ennykttppv ldsdgsffly skltvdksrw  
 301 qqgnvfscsv mhealthnhyt qkslslspgk

**(9) Sequência de Ácido Nucléico que Codifica a Região Variável da Cadeia Pesada de Hu2B8 Hv1f.1 Humanizado de Extensão Completa**

e a Região Constante da Cadeia Pesada de IgG1 humana (alótipo G1m(17,1)) (sequência de sinal sublinhada) (SEQ ID NO. 162)

```

1      atggactgca      cctggaggat      cctcctcttg
gtggcagcag ctacagggcac ccacgccgag
61     gtccagctgg      tacagtctgg      ggctgaggtg
aagaagcctg gggctacagt gaaaatctcc
121    tgcaagggttt      ctggatacac      cttcaccacc
tactggatgc actgggtgca acaggcccct
181    ggaaaagggc      ttgagtggat      gggagagatt
aatcctacca acggtcatac taactacaat
241    gagaagttcc      agggcagagt      caccataacc
gcgacacgt  ctacagacac agcctacatg
301    gagctgagca      gcctgagatc      tgaggacacg
gccgtgtatt actgtgcaac aaactatggt
361    ggtagcatct      ttgactactg      gggccaagga
accctggcca cgtctctctc agcctccacc
421    aagggcccat      cggctcttccc      cctggcacc
tcctccaaga gcacctctgg gggcacagcg
481    gccctgggct      gcctgggtcaa      ggactacttc
cccgaaccgg tgacgggtgtc gtggaactca
541    ggcgccctga      ccagcggcgt      gcacaccttc
cgggtgtcc  tacagtctctc aggactctac
601    tcctcagca      gcgtgggtgac      cgtgccctcc
agcagcttgg gcaccagac  ctacatctgc
661    aacgtgaatc      acaagcccag      caacaccaag
gtggacaaga aagttgagcc caaatcttgt
721    gacaaaactc      acacatgccc      accgtgccca
gcacctgaac tcctgggggg accgtcagtc
781    ttctcttcc      ccccaaacc      caaggacacc
ctcatgatct cccggacccc tgaggtcaca
841    tgcgtggtgg      tggacgtgag      ccacgaagac

```

cctgaggtca agttcaactg gtacgtggac  
 901 ggcgtggagg tgcataatgc caagacaaag  
 ccgcgggagg agcagtacaa cagcacgtac  
 961 cgtgtgggtca gcgtcctcac cgtcctgcac  
 caggactggc tgaatggcaa ggagtacaag  
 1021 tgcaaggtct ccaacaaagc cctcccagcc  
 cccatcgaga aaaccatctc caaagccaaa  
 1081 gggcagcccc gagaaccaca ggtgtacacc  
 ctgcccccat cccgggatga gctgaccaag  
 1141 aaccaggtca gcctgacctg cctgggtcaaa  
 ggcttctatc ccagcgacat cgccgtggag  
 1201 tgggagagca atgggcagcc ggagaacaac  
 tacaagacca cgctcccgt gctggactcc  
 1261 gacggctcct tcttcctcta cagcaagctc  
 accgtggaca agagcaggtg gcagcagggg  
 1321 aacgtcttct catgctccgt gatgcatgag  
 gctctgcaca accactacac gcagaagagc  
 1381 ctctccctgt ctccgggtaa atga

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

1 evqlvqsgae vkkpgatvki sckvsgytft  
 tywmhvwqqa pgkglewmge inptnghtny  
 61 nekfggrvti tadtstdtay melsslrsed  
 tavyycatny vgsifdywgq gtlvtvssas  
 121 tkgpsvfpla psskstsggt aalgclvkdy  
 fpepvtvswn sgaltsgvht fpavllqssgl  
 181 yslssvvtvp ssslgtqtyi cnvnhkpsnt  
 kvdkkvepks cdkthtcpc papellgpps  
 241 vflfppkpkd tlmisrtpev tcvvvdvshe



dpevkfnwyv dgvevhnakt kpreeqynst

301 yrvvsvltvl hqdwlngkey kckvsnkalp  
apiektiska kgqprepvy tlpssrdelt

361 knqvsltclv kgfypsdiav ewesngqpen  
nykttppvld sdgsfflysk ltvdksrwqq

421 gnvfscsvmh ealhnhytqk slslspgk

**(11) Sequência de Ácido Nucléico que Codifica a Região Variável da Cadeia Pesada de Hu2B8 Hv5a.1 Humanizado (sequência de sinal sublinhada) (SEQ ID NO. 164)**

1 atggggtcaa cgcctcctc  
ctggctgttc tccaaggagt ctgtgccgaa

61 gtgcagctgg tgcagtctgg agcagaggtg  
aaaaagcccg gggagtctct gaggatctcc

121 tgtaagggtt ctggatacag ctttaccacc  
tactggatgc actgggtgcg ccagatgccc

181 gggaaaggcc tggagtggat gggggagatt  
aatcctacca acggtcatac taactacaat

241 ccgtccttcc aaggccacgt caccatctca  
gctgacaagt ccatcagcac tgcctacctg

301 cagtggagca gcctgaaggc ctccggacacc  
gccatgtatt actgtgagag aaactatggt

361 ggtagcatct ttgactactg gggccaagga  
accctgggtca ccgtctcctc ag

**(12) Sequência de Proteína que Define a Região Variável da Cadeia Pesada de Hu2B8 Hv5a.1 Humanizado (sem sequência de sinal) (SEQ ID NO. 165)**

1 evqlvqsgae vkkpgeslri sckgsgysft  
tywmhwvrqm pgkglewmge inptnghtny

61 npsfqghvti sadksistay lqwsslkasd  
tamyycarny vgsifdywgq gtlvtvss

**(13) Sequência de Ácido Nucléico que Codifica a Região Variável da**

Cadeia Pesada de Extensão Completa de Hu2B8 Hv5a.1 Humanizado e a Região Constante da Cadeia Pesada de IgG1 Humana (alótipo G1m(17,1)) (sequência de sinal sublinhada) (SEQ ID NO. 166)

```

1      atggggtcaa      cgcctatcct      cgccctcctc
ctggctgttc tccaaggagt ctgtgccgaa
61      gtgcagctgg      tgcagtctgg      agcagaggtg
aaaaagcccg gggagtctct gaggatctcc
121     tgtaagggtt      ctggatacag      ctttaccacc
tactggatgc actgggtgcg ccagatgccc
181     gggaaaggcc      tggagtggat      gggggagatt
aatcctacca acggtcatac taactacaat
241     ccgtccttcc      aaggccacgt      caccatctca
gctgacaagt ccatcagcac tgcctacctg
301     cagtggagca      gcctgaaggc      ctcggacacc
gccatgtatt actgtgcgag aaactatggt
361     ggtagcatct      ttgactactg      gggccaagga
accctggcca ccgtctcctc agcctccacc
421     aagggcccat      cggctcttccc     cctggcacc
tctccaaga gcacctctgg gggcacagcg
481     gccctgggct      gcctgggtcaa     ggactacttc
cccgaaccgg tgacgggtgtc gtggaactca
541     ggcgccttga      ccagcggcgt      gcacaccttc
ccggctgtcc tacagtcttc aggactctac
601     tccctcagca      gcgtggtgac      cgtgccctcc
agcagcttgg gcaccagac ctacatctgc
661     aacgtgaatc      acaagcccag      caacaccaag
gtggacaaga aagttgagcc caaatcttgt
721     gacaaaactc      acacatgccc      accgtgccc
gcacctgaac tcctgggggg accgtcagtc
781     ttctcttcc      ccccaaaacc      caaggacacc
ctcatgatct cccggacccc tgaggtcaca

```

841 tgcgtggtgg tggacgtgag ccacgaagac  
 cctgaggtca agttcaactg gtacgtggac  
 901 ggcgtggagg tgcataatgc caagacaaag  
 ccgcgggagg agcagtacaa cagcacgtac  
 961 cgtgtggtca gcgtcctcac cgtcctgcac  
 caggactggc tgaatggcaa ggagtacaag  
 1021 tgcaaggtct ccaacaaagc cctcccagcc  
 cccatcgaga aaaccatctc caaagccaaa  
 1081 gggcagcccc gagaaccaca ggtgtacacc  
 ctgcccccat cccgggatga gctgaccaag  
 1141 aaccaggtca gcctgacctg cctgggtcaaa  
 ggcttctatc ccagcgacat cgccgtggag  
 1201 tgggagagca atgggcagcc ggagaacaac  
 tacaagacca cgctcccgt gctggactcc  
 1261 gacggctcct tcttctctta cagcaagctc  
 accgtggaca agagcaggtg gcagcagggg  
 1321 aacgtcttct catgctccgt gatgcatgag  
 gctctgcaca accactacac gcagaagagc  
 1381 ctctccctgt ctccgggtaa atga

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

1 evqlvqsgae vkkpgeslri sckgsgysft  
 tywmhwvrqm pgkglewmge inptnghtny  
 61 npsfqghvti sadksistay lqwsslkasd  
 tamyycarny vgsifdywgq gtlvtvssas  
 121 tkgpsvfpla psskstsggt aalgclvkdy  
 fpepvtvswn sgaltsgvht fpavllqssgl  
 181 yslssvvtvp ssslgtqtyi cnvnhkpsnt  
 kvdkkvepks cdkthtcpcp papellggps

241 vflfppkpkd tlmisrtpev tcvvvdvshe  
 dpevkfnwyv dgvevhnakt kpreeqynst  
 301 yrvvsvltvl hqdwlngkey kckvsnkalp  
 apiektiska kgqprepqvy tlppsrdeft  
 361 knqvsltclv kgfypsdiav ewesngqpen  
 nykttppvld sdgsfflysk ltvdksrwqq  
 421 gnvfscsvmh ealhnhytqk slslspgk

**(15) Sequência de Ácido Nucléico que Codifica a Região variável da cadeia Pesada de Hu2B8 Hv5-51.1 Humanizado (sequência de sinal sublinhada) (SEQ ID NO. 168)**

1 atgggggtcaa cgcctatcct cgccctcctc  
ctggctgttc tccaaggagt ctgtgccgaa  
 61 gtgcagctgg tgcagtctgg agcagaggtg  
 aaaaagcccg gggagtctct gaagatctcc  
 121 tgtaagggtt ctggatacag ctttaccacc  
 tactggatgc actgggtgcg ccagatgcc  
 181 gggaaaggcc tggagtggat gggggagatt  
 aatcctacca acggtcatac taactacaat  
 241 ccgtccttcc aaggccaggt caccatctca  
 gctgacaagt ccatcagcac tgcctacctg  
 301 cagtggagca gcctgaaggc ctccggacacc  
 gccatgtatt actgtgagag aaactatggt  
 361 ggtagcatct ttgactactg gggccaagga  
 accctgggtca ccgtctcctc ag

**(16) Sequência de Proteína que Define a Sequência Variável de Cadeia Pesada de Hu2B8 Hv5-51.1 Humanizado (sem sequência de sinal) (SEQ ID NO. 169)**

1 evqlvqsgae vkkpgeslki sckgsgysft tywmhwvrqm  
 pgkglewmge inptnghtny  
 61 npsfqqqvti sadksistay lqwsslkasd  
 tamyycarny vgsifdywgq gtlvtvss

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

```

      1   atggggtcaa   cgcccatcct   cgccctcctc
ctggctgttc tccaaggagt ctgtgccgaa
     61   gtgcagctgg   tgcagtctgg   agcagaggtg
aaaaagcccg gggagtctct gaagatctcc
    121   tgtaagggtt   ctggatacag   ctttaccacc
tactggatgc actgggtgcg ccagatgccc
    181   gggaaaggcc   tggagtggat   gggggagatt
aatcctacca acggtcatac taactacaat
    241   ccgtccttcc   aaggccaggt   caccatctca
gctgacaagt ccatcagcac tgcctacctg
    301   cagtggagca   gcctgaaggc   ctcggacacc
gccatgtatt actgtgcgag aaactatggt
    361   ggtagcatct   ttgactactg   gggccaagga
accctgggtca ccgtctcctc agcctccacc
    421   aagggcccat   cggctcttccc cctggcacc
tcctccaaga gcacctctgg gggcacagcg
    481   gccctgggct   gcctgggtcaa ggactacttc
cccgaaccgg tgacgggtgtc gtggaactca
    541   ggcgccttga   ccagcggcgt   gcacaccttc
ccggctgtcc tacagtctc aggactctac
    601   tccctcagca   gcgtgggtgac cgtgccctcc
agcagcttgg gcacccagac ctacatctgc
    661   aacgtgaatc   acaagcccag   caacaccaag
gtggacaaga aagttgagcc caaatcttgt
    721   gacaaaactc   acacatgccc   accgtgcca
gcacctgaac tcctgggggg accgtcagtc

```

781      ttcctcttcc      ccccaaaacc      caaggacacc  
 ctcatgatct cccggacccc tgaggtcaca  
 841      tgcgtggtgg      tggacgtgag      ccacgaagac  
 cctgagggtca agttcaactg gtacgtggac  
 901      ggcgtggagg      tgcataatgc      caagacaaag  
 ccgcgggagg agcagtacaa cagcacgtac  
 961      cgtgtggtca      gcgtcctcac      cgtcctgcac  
 caggactggc tgaatggcaa ggagtacaag  
 1021     tgcaaggtct      ccaacaaagc      cctcccagcc  
 cccatcgaga aaaccatctc caagccaaa  
 1081     gggcagcccc      gagaaccaca      ggtgtacacc  
 ctgcccccat cccgggatga gctgaccaag  
 1141     aaccaggtca      gcctgacctg      cctggtcaaa  
 ggcttctatc ccagcgacat cgccgtggag  
 1201     tgggagagca      atgggcagcc      ggagaacaac  
 tacaagacca cgctcccgt gctggactcc  
 1261     gacggctcct      tcttcctcta      cagcaagctc  
 accgtggaca agagcaggtg gcagcagggg  
 1321     aacgtcttct      catgctccgt      gatgcatgag  
 gctctgcaca accactacac gcagaagagc  
 1381     ctctccctgt ctccgggtaa atga

**(18) Sequência de Proteína que Define a Região variável da cadeia Pesada de Extensão Completa de Hu2B8 Hv5-51.1 Humanizado e a Região Constante da Cadeia Pesada de IgG1 Humana (alótipo G1m(17,1)) (sem sequência de sinal) (SEQ ID NO. 171)**

1        evqlvqsgae      vkkpgeslki      sckgsgysft  
 tywmhwvrqm pgkglewmge inptnghtny  
 61        npsfqqqvti      sadsistay      lqwsslkasd  
 tamyycarny vgsifydwgq gtlvtvssas  
 121       tkgpsvfpla      psskstsggt      aalgclvkdy  
 fpepvtvswn sgaltsgvht fpavllqssgl

181 yslssvvtvp ssslgtqtyi cnvnhkpsnt  
 kvdkkvepks cdkthtcppc papellggps  
 241 vflfppkpkd tlmisrtpev tcvvvdvshe  
 dpevkfnwyv dgvevhnakt kpreeqynst  
 301 yrvvsvltvl hqdwlngkey kckvsnkalp  
 apiektiska kgqprepqv tlpssrdelt  
 361 knqvsltclv kgfypsdiav ewesngqpen  
 nykttppvld sdgsfflysk ltvdksrwqq  
 421 gnvfscsvmh ealhnhytqk slslspgk

**(19) Sequência de Ácido Nucléico que Codifica a Região Variável da Cadeia Capa de Hu2B8 Kv1-39.1 Humanizado (sequência de sinal sublinhada) (SEQ ID NO. 172).** Dois possíveis ATGs de início são mostrados em letras maiúsculas.

1 ATGgacATGa gggtccccgc tcagctcctg  
gggctcctgc tactctggct ccgaggtgcc  
 61 agatgtgaca tccagatgac ccagtctcca  
 tcctccctgt ctgcatctgt aggagacaga  
 121 gtcacatca cttgcaaggc cagtgagaat  
 gtggtttctt atgtatcctg gtatcagcag  
 181 aaaccaggga aagcccctaa gctcctgatc  
 tatggggcat ccaaccggaa cactgggggtc  
 241 ccatcaaggt tcagtggcag tggatctggg  
 acagatttca ctctcaccat cagcagtctg  
 301 caacctgaag attttgcaac ttactactgt  
 gggcagagtt acaactatcc gtacacgttt  
 361 ggccagggga ccaagctgga gatcaaac

**(20) Sequência de Proteína que Define a Região Variável da Cadeia Capa de Hu2B8 Kv1-39.1 Humanizado (sem sequência de sinal) (SEQ ID NO. 173)**

1 diqmtqspss lsasvgdrvt itckasenvv  
 syvswyqqkp gkapklliyg asnrntgvps

61 r fsgsgsgtd f tltisslqp edfatyycgq  
synpytfgq g tkleik

**(21) Sequência de Ácido Nucléico que Codifica a Região Constante da Cadeia Capa Humana (alótipo Km(3)) (alelo 2) (SEQ ID NO. 174)**

1 gaactgtggc tgcaccatct gtcttcatct  
tcccgccatc tgatgagcag ttgaaatctg

61 gaactgcctc tgttgtgtgc ctgctgaata  
acttctatcc cagagaggcc aaagtacagt

121 ggaaggtgga taacgccctc caatcgggta  
actcccagga gagtgtcaca gagcaggaca

181 gcaaggacag cacctacagc ctcagcagca  
ccctgacgct gagcaaagca gactacgaga

241 aacacaaagt ctacgcctgc gaagtcaccc  
atcagggcct gagctcgccc gtcacaaaga

301 gcttcaacag gggagagtgt tga

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

1 rtvaapsvfi fppsdeqlks gtasvvc1ln  
nfybreakvq wkvdnalqsg nsqesvteqd

61 skdstyslss tltlskadye khkvyacevt  
hqglsspvtk sfnrgec

**(23) Sequência de Ácido Nucléico que Codifica a Região Variável da Cadeia Leve de Extensão Completa de Hu2B8 Kv1-39.1 Humanizado e a Região Constante da Cadeia Capa Humana (alótipo Km(3)) (alelo 2) (sequência de sinal sublinhada) (SEQ ID NO. 176)**

1 atggacatga gggtccccgc tcagctcctg  
gggctcctgc tactctggct ccgaggtgcc

61 agatgtgaca tccagatgac ccagctctcca



tcctccctgt ctgcatctgt aggagacaga  
           121      gtcaccatca      cttgcaaggc      cagtgagaat  
 gtggtttctt atgtatcctg gtatcagcag  
           181      aaaccaggga      aagcccctaa      gctcctgatc  
 tatggggcat ccaaccggaa cactgggggtc  
           241      ccatcaaggt      tcagtggcag      tggatctggg  
 acagatttca ctctcaccat cagcagtctg  
           301      caacctgaag      attttgcaac      ttactactgt  
 gggcagagtt acaactatcc gtacacgttt  
           361      ggccagggga      ccaagctgga      gatcaaacga  
 actgtggctg caccatctgt cttcatcttc  
           421      ccgccatctg      atgagcagtt      gaaatctgga  
 actgcctctg ttgtgtgcct gctgaataac  
           481      ttctatccca      gagaggccaa      agtacagtgg  
 aaggtggata acgccctcca atcgggtaac  
           541      tcccaggaga      gtgtcacaga      gcaggacagc  
 aaggacagca cctacagcct cagcagcacc  
           601      ctgacgctga      gcaaagcaga      ctacgagaaa  
 cacaaagtct acgcctgcga agtcacccat  
           661      cagggcctga      gctcgcccgt      caciaagagc  
 ttcaacaggg gagagtgttg a

**(24) Sequência de Proteína que Define a Região Variável da Cadeia  
 Leve de Extensão Completa de Hu2B8 Kv1-39.1 Humanizado e a  
 Região Constante da Cadeia Capa Humana (alótipo Km(3)) (alelo 1)  
 (SEQ ID NO. 177)**

          1      diqmtqspss      lsasvgdrvt      itckasenvv  
 syvswyqqkp gkapklliyg asnrntgvps  
           61      rfsgsgsgtd      ftltisslqp      edfatyycgq  
 synpytfgq gtkleikrtv aapsvfifpp  
           121      sdeqlksgta      svvcllnnfy      preakvqwkv  
 dnalqsgnsq esvteqdskd styslsstlt

181 lskadyekhk vyacevthqg lsspvtksfn rgec

**(25) Sequência de Ácido Nucléico que Codifica a Região Variável da Cadeia Leve de Hu2B8 Kv3-15.1 Humanizado (sequência de sinal sublinhada) (SEQ ID NO. 178)**

1        atggaagccc        cagcgcagct        tctcttcctc  
 ctgctactct ggctcccaga taccactgga  
 61        gaaatagtga        tgacgcagtc        tccagccacc  
 ctgtctgtgt ctccagggga aagagccacc  
 121        ctctcctgca        aggccagtga        gaatgtggtt  
 tcttatgtat cctggtacca gcagaaacct  
 181        ggccaggctc        ccaggctcct        catctatggg  
 gcatccaacc ggaacactgg tatcccagcc  
 241        aggttcagtg        gcagtgggtc        tgggacagag  
 ttcactctca ccatcagcag cctgcagtct  
 301        gaagattttg        cagtttatta        ctgtgggcag  
 agttacaact atccgtacac gtttggccag  
 361 gggaccaagc tggagatcaa ac

**(26) Sequência de Proteína que Define a Região Variável da Cadeia Leve de Hu2B8 Kv3-15.1 Humanizado (sem sequência de sinal) (SEQ ID NO. 179)**

1        eivmtqspat        lsvspgerat        lsckasenvv  
 syvswyqqkp gqaprlliyg asnrntgipa  
 61        rfsgsgsgte        ftltisslqs        edfavyycgq  
 synpytfgq gtkleik

**(27) Ácido Nucléico que Codifica a Região Variável de Cadeia Leve de Extensão Completa de Hu2B8 Kv3-15.1 Humanizado e a Região Constante da Cadeia Capa Humana (alótipo Km(3)) (alelo 2) (sequência de sinal sublinhada) (SEQ ID NO. 180)**

1        atggaagccc        cagcgcagct        tctcttcctc  
 ctgctactct ggctcccaga taccactgga  
 61        gaaatagtga        tgacgcagtc        tccagccacc

ctgtctgtgt ctccagggga aagagccacc  
           121      ctctcctgca      aggccagtga      gaatgtggtt  
 tcttatgtat cctggtacca gcagaaacct  
           181      ggccaggctc      ccaggctcct      catctatggg  
 gcatccaacc ggaacactgg tatcccagcc  
           241      aggttcagtg      gcagtgggtc      tgggacagag  
 ttcactctca ccatcagcag cctgcagtct  
           301      gaagatthttg      cagthttatta      ctgtgggcag  
 agttacaact atccgtacac gthttggccag  
           361      gggaccaagc      tggagatcaa      acgaactgtg  
 gctgcaccat ctgtcttcat cttcccgcc  
           421      tctgatgagc      agttgaaatc      tggaaactgcc  
 tctgttgtgt gcctgctgaa taacttctat  
           481      cccagagagg      ccaaagtaca      gtggaaggtg  
 gataacgcc tccaatcggg taactcccag  
           541      gagagtgtca      cagagcagga      cagcaaggac  
 agcacctaca gcctcagcag caccctgacg  
           601      ctgagcaaag      cagactacga      gaaacacaaa  
 gtctacgcct gcgaagtcac ccatcagggc  
           661      ctgagctcgc      ccgtcacaaa      gagcttcaac  
 aggggagagt gttga

**(28) Sequência de Proteína que Define a Região Variável da Cadeia Leve de Hu2B8 Kv3-15.1 Humanizado e a Região Constante da Cadeia Capa Humana (Km(3) alótipo) (alelo 2) (sem sequência de sinal) (SEQ ID NO. 181)**

          1      eivmtqspat      lsvspgerat      lsckasenvv  
 syvswyqqkp gqaprlliyg asnrntgipa  
           61      rfsgsgsgte      ftltisslqs      edfavyycgq  
 synpytfgq gtkleikrtv aapsvfifpp  
           121      sdeqlksgta      svvcllnnfy      preakvqwkv  
 dnalqsgnsq esvteqdskd styslsstlt

181 lskadyekhk vyacevthqg lsspvtksfn rgec

[000198] Para conveniência, a Tabela 13 fornece um quadro de concordância mostrando uma correspondência entre as sequências de extensão completa e os anticorpos discutidos nesta seção com aqueles apresentados na Listagem de Sequência.

**TABELA 13**

SEQ. ID NO.	Proteína ou Ácido Nucléico
154	IgG1 de 2B8 quimérico (G1m(17,1)) – ácido nucléico
155	IgG1 de 2B8 quimérico (G1m(17,1)) – proteína
156	Capa de 2B8 quimérico (Km(3)) – ácido nucléico
157	Capa de 2B8 quimérico (Km(3)) – proteína
158	Região Variável da Cadeia Pesada de Hu2B8 Hv1f.1 – ácido nucléico
159	Região Variável da Cadeia Pesada de Hu2B8 Hv1f.1 – proteína
160	Região Constante da Cadeia Pesada de IgG1 Humana (Alótipo G1m(17,1)) – ácido nucléico
161	Região Constante da Cadeia Pesada de IgG1 Humana (Alótipo G1m(17,1)) – proteína
162	Hu2B8 Hv1f.1 + Constante de IgG1 (Alótipo G1m(17,1)) – ácido nucléico
163	Hu2B8 Hv1f.1 + Constante de IgG1 (Alótipo G1m(17,1)) – proteína
164	Região Variável da Cadeia Pesada de Hu2B8 Hv5a.1 – ácido nucléico
165	Região Variável da Cadeia Pesada de Hu2B8 Hv5a.1 – proteína
166	Hu2B8 Hv5a.1 + Constante de IgG1 (Alótipo G1m(17,1)) – ácido nucléico
167	Hu2B8 Hv5a.1 + Constante de IgG1 (Alótipo G1m(17,1)) – proteína
168	Região Variável da Cadeia Pesada de Hu2B8 Hv5-51.1 – ácido nucléico
169	Região Variável da Cadeia Pesada de Hu2B8 Hv5-51.1 – proteína
170	Hu2B8 Hv5-51.1 + Constante de IgG1 (Alótipo G1m(17,1)) – ácido nucléico
171	Hu2B8 Hv5-51.1 + Constante de IgG1 (Alótipo G1m(17,1)) – proteína
172	Hu2B8 Kv1-39.1 Região Variável de Cadeia Capa – ácido nucléico
173	Hu2B8 Kv1-39.1 Região Variável de Cadeia Capa – proteína
174	Região Constante da Cadeia Capa Humana (Alótipo Km(3)) (alelo 2) – ácido nucléico
175	Região Constante da Cadeia Capa Humana (Alótipo Km(3)) (alelo 2) – proteína
176	Hu2B8 Kv1-39.1 + Constante capa (Alótipo Km(3)) (alelo 2) – ácido nucléico
177	Hu2B8 Kv1-39.1 + Constante capa (Alótipo Km(3)) (alelo 2) – proteína
178	Região Variável de Cadeia Capa de Hu2B8 Kv3-15.1 – ácido nucléico
179	Região Variável de Cadeia Capa de Hu2B8 Kv3-15.1 – proteína
180	Hu2B8 Kv3-15.1 + Constante capa (Alótipo Km(3)) (alelo 2) – ácido nucléico
181	Hu2B8 Kv3-15.1 + Constante capa (Alótipo Km(3)) (alelo 2) – proteína

#### **B. Procedimento de Humanização 2**

[000199] O Segundo método de humanização empregado para reduzir a imunogenicidade do anticorpo 2B8 de camundongo se baseia no método descrito por Studnicka *et al.* (1994) PROTEIN ENG. 7:805-814. As regiões variáveis de linhagem germinativa pesada e capa

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

[000200] As sequências de ácido nucléico codificantes e as sequências de proteína que definem cada um dos anticorpos

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

**(1) Sequência de Ácido Nucléico que Codifica a Região Variável da Cadeia Pesada de LR2B8HC Humanizado (sequência de sinal sublinhada) (SEQ ID NO. 182)**

```

      1   atgggctggt   catatattat   tctctttctt
gttgctaccg ctaccgatgt gcactctcaa
      61   gtccaactcg   tacaaccagg   cgctgaagtc
gtaaaacccg gaacatctgt taaactctca
     121   tgcaaagcct   caggatacac   tttcacaact
tactggatgc attgggtcaa tcaagcccc
     181   ggacaaggcc   tcgaatggat   tggcgaaatt
aacccaacta acggacatac taattataat
     241   gaaaaattta   agggcaaagc   tacactcacc
gtcgataaat caacctctac agcttatatg
     301   gaactttcat   ccctgagatc   agaagataca
gccgtctact attgcgccag aaactacgta
     361   ggatcaatat   tcgattactg   gggccaaggc
actctcctca cagtcagctc ag

```

**(2) Sequência de Proteína que Define a Região Variável da Cadeia Pesada de LR2B8HC Humanizado (sem sequência de sinal) (SEQ ID NO. 183)**

```

      1   qvqlvqpgae   vvkpgtsvkl   sckasgytft
tywmhwnqqa pgqglewige inptnghtny
     61   nekfkqkatl   tvdkststay   melsslrsed
tavyycarny vgsifdywgq gtlitvss

```

**(3) Sequência de Ácido Nucléico que Codifica a Região Constante da**

Cadeia Pesada de IgG1 Humana (Alótipo G1m(3)) (alelo 1) (SEQ ID NO. 184)

```

1      ccagcacaaa      gggcccatcg      gtcttcccc
tggcaccctc ctccaagagc acctctgggg
61     gcacagcggc      cctgggctgc      ctggtcaagg
actacttccc cgaaccggtg acggtgtcgt
121    ggaactcagg      cgccctgacc      agcggcgtgc
acaccttccc ggctgtccta cagtcctcag
181    gactctactc      cctcagcagc      gtggtgaccg
tgccctccag cagcttgggc acccagacct
241    acatctgcaa      cgtgaatcac      aagcccagca
acaccaaggt ggacaagaga gttgagcca
301    aatcttgtga      caaaactcac      acatgtccac
cgtgcccagc acctgaactc ctggggggac
361    cgtcagtctt      cctcttcccc      ccaaaacca
aggacaccct catgatctcc cggaccctg
421    aggtcacatg      cgtggtggtg      gacgtgagcc
acgaagacc  tgaggtaag  ttcaactggt
481    acgtggacgg      cgtggaggtg      cataatgcca
agacaaagcc gcgggaggag cagtacaaca
541    gcacgtaccg      tgtggtcagc      gtctcaccg
tctgcacca  ggactggctg aatggcaagg
601    agtacaagtg      caaggtctcc      aaaaagccc
tcccagcccc catcgagaaa accatctcca
661    aagccaaagg      gcagccccga      gaaccacagg
tgtacaccct gccccatcc  cgggaggaga
721    tgaccaagaa      ccaggtcagc      ctgacctgcc
tggtcaaagg cttctatccc agcgacatcg
781    ccgtggagtg      ggagagcaat      gggcagccgg
agaacaacta caagaccagc cctcccgtgc
841    tggactccga      cggctccttc      ttctctata

```

gcaagctcac cgtggacaag agcaggtggc  
 901 agcaggggaa cgtcttctca tgctccgtga  
 tgcatgaggc tctgcacaac cactacacgc  
 961 agaagagcct ctccctgtcc ccgggtaaata ga

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

1 astkgpsvfp lapsskstsg gtaalgclvk  
 dyfpepvtvs wnsgaltsgv htfpavlgss  
 61 glyslssvvt vpssslgtqt yicnvnhkps  
 ntkvdkrvep kscdkthtcp pcpapellgg  
 121 psvflfppkp kdtlmisrtp evtcvvvdvs  
 hedpevkfnw yvdgvevhna ktkpreeqyn  
 181 styrvvsvlt vlhqdwlngk eykckvsnka  
 lpapiektis kakgqprepq vytlppsree  
 241 mtknqvsltc lvkgfypsdi avewesngqp  
 ennykttppv ldsdgsffly skltvdksrw  
 301 qqgnvfscsv mhealnhnyt qkslslspgk

**(5) Sequência de Ácido Nucléico que Codifica a Região Variável da Cadeia Pesada de de Extensão Completa de LR2B8HC Humanizado e a Região Constante da Cadeia Pesada de IgG1 Humana (Alótipo G1m(3)) (alelo 1) (sequência de sinal sublinhada) (SEQ ID NO. 186)**

1 atgggctggt catatattat tctctttctt  
gttgctaccg ctaccgatgt gcactctcaa  
 61 gtccaactcg tacaaccagg cgctgaagtc  
 gtaaaacccg gaacatctgt taaactctca  
 121 tgcaaagcct caggatacac tttcacaact  
 tactggatgc attgggtcaa tcaagccccc  
 181 ggacaaggcc tcgaatggat tggcgaaatt



aacc caacta acggacatac taattataat  
241 gaaaaattta agggcaaagc tacactcacc  
gtcgataaat caacctctac agcttatatg  
301 gaactttcat ccctgagatc agaagataca  
gccgtctact attgcgccag aaactacgta  
361 ggatcaatat tcgattactg ggggtcaaggc  
actctcctca cagtcagctc agccagcaca  
421 aagggcccat cggctctccc cctggcacc  
tcctccaaga gcacctctgg gggcacagcg  
481 gccctgggct gcctgggtcaa ggactacttc  
cccgaaccgg tgacgggtgct gtggaactca  
541 ggcgccctga ccagcggcgt gcacaccttc  
ccggctgtcc tacagtcctc aggactctac  
601 tccctcagca gcgtggtgac cgtgccctcc  
agcagcttgg gcaccagac ctacatctgc  
661 aacgtgaatc acaagcccag caacaccaag  
gtggacaaga gagttgagcc caaatcttgt  
721 gacaaaactc acacatgtcc accgtgcca  
gcacctgaac tcctgggggg accgtcagtc  
781 ttctcttcc ccccaaaacc caaggacacc  
ctcatgatct cccggacccc tgaggtcaca  
841 tgcgtggtgg tggacgtgag ccacgaagac  
cctgagggtca agttcaactg gtacgtggac  
901 ggcgtggagg tgcataatgc caagacaaag  
ccgcgggagg agcagtacaa cagcacgtac  
961 cgtgtggtca gcgtcctcac cgtcctgcac  
caggactggc tgaatggcaa ggagtacaag  
1021 tgcaaggtct ccaacaaagc cctcccagcc  
cccatcgaga aaaccatctc caagccaaa  
1081 gggcagcccc gagaaccaca ggtgtacacc  
ctgcccccat cccgggagga gatgaccaag

1141 aaccagggtca gcctgacctg cctgggtcaaa  
 ggcttctatc ccagcgacat cgccgtggag  
 1201 tgggagagca atgggcagcc ggagaacaac  
 tacaagacca cgctcccgt gctggactcc  
 1261 gacggctcct tcttcctcta tagcaagctc  
 accgtggaca agagcaggtg gcagcagggg  
 1321 aacgtcttct catgctccgt gatgcatgag  
 gctctgcaca accactacac gcagaagagc  
 1381 ctctccctgt ccccgggtaa atga

**(6) Sequência de Proteína que Define a Região Variável da Cadeia Pesada de Extensão Completa de LR2B8HC Humanizado e a Região Constante da Cadeia Pesada de IgG1 Humana (Alótipo G1m(3)) (alelo 1) (sem sequência de sinal) (SEQ ID NO. 187)**

1 qvqlvqpgae vvkpgtsvkl sckasgytft  
 tywmhwnqa pgqglewige inptnghtny  
 61 nekfkkgkatl tvdkststay melsslrsed  
 tavyycarny vgsifdywgq gtlitvssas  
 121 tkgpsvfpla psskstsggt aalgclvkdy  
 fpepvtvswn sgaltsgvht fpavllqssgl  
 181 yslssvvtvp ssslgtqtyi cnvnhkpsnt  
 kvdkrvepks cdkthtcppc papellggps  
 241 vflfppkpkd tlmisrtpev tcvvvdvshe  
 dpevkfnwyv dgvevhnakt kpreeqynst  
 301 yrvvsvltvl hqdwlngkey kckvsnkalp  
 apiektiska kgqprepqv tlpssreemt  
 361 knqvsltclv kgfypsdiav ewesngqpen  
 nykttppvld sdgsfflysk ltvdkstrwqq  
 421 gnvfscsvmh ealhnhytqk slslspgk

**(7) Sequência de Ácido Nucléico que Codifica a Região Variável da Cadeia Pesada de LRMR2B8HC Humanizado (sequência de sinal sublinhada) (SEQ ID NO. 188)**

1     atgggttggt     catatattat     actctttctc  
gtagccaccg ccaccgacgt acactctcag  
 61     gttcaactcg     tacaaccg     cgccgaagtc  
 aagaaaccag gaacatcagt caaactctca  
 121     tgtaaagcaa     gcggatacac     ctttactact  
 tattggatgc attgggtaag acaagcccc  
 181     ggacaaggac     tcgaatggat     aggcgaaata  
 aatcccacta atggacatac aaattataat  
 241     caaaaatttc     aaggacgcgc     tacactcacc  
 gtcgataaat caacctcaac cgcatacatg  
 301     gaactcagct     ccctccgatc     cgaagacact  
 gccgtttatt attgtgccag aaactatgta  
 361     ggatctat     tcgattactg     gggacaagga  
 acacttctca ccgtaagctc ag

**(8) Sequência de Proteína que Define a Região Variável da Cadeia Pesada de LRMR2B8HC Humanizado (sem sequência de sinal) (SEQ ID NO. 189)**

1     qvqlvqpgae     vkkpgtsvkl     sckasgytft  
 tywmhwvrqa pggglewige inptnghtny  
 61     nqkfqgratl     tvdkststay     melsslrsed  
 tavyycarny vgsifdywgq gtlitvss

**(9) Sequência de Ácido Nucléico que Codifica a Região Variável da Cadeia Pesada de de Extensão Completa de LRMR2B8HC Humanizado e a Região Constante da Cadeia Pesada de IgG1 Humana (Alótipo G1m(3)) (alelo 1) (sequência de sinal sublinhada) (SEQ ID NO. 190)**

1     atgggttggt     catatattat     actctttctc  
gtagccaccg ccaccgacgt acactctcag  
 61     gttcaactcg     tacaaccg     cgccgaagtc  
 aagaaaccag gaacatcagt caaactctca  
 121     tgtaaagcaa     gcggatacac     ctttactact

tattggatgc attgggtaag acaagccccc  
181 ggacaaggac tcgaatggat aggcgaaata  
aatcccacta atggacatac aaattataat  
241 caaaaatttc aaggacgcgc tacactcacc  
gtcgataaat caacctcaac cgcatacatg  
301 gaactcagct ccctccgatc cgaagacact  
gccgtttatt attgtgccag aaactatgta  
361 ggatctattt tcgattactg gggacaagga  
acacttctca ccgtaagctc agccagcaca  
421 aagggcccat cggctcttccc cctggcacc  
tcctccaaga gcacctctgg gggcacagcg  
481 gccctgggct gcctgggtcaa ggactacttc  
cccgaaccgg tgacgggtgc gtggaactca  
541 ggcgccctga ccagcggcgt gcacaccttc  
ccggctgtcc tacagtctc aggactctac  
601 tcctcagca gcgtgggtgac cgtgccctcc  
agcagcttgg gcacccagac ctacatctgc  
661 aacgtgaatc acaagcccag caacaccaag  
gtggacaaga gagttgagcc caaatcttgt  
721 gacaaaactc acacatgtcc accgtgcca  
gcacctgaac tcctgggggg accgtcagtc  
781 ttctcttcc ccccaaacc caaggacacc  
ctcatgatct cccggacccc tgaggtcaca  
841 tgcgtgggtg tggacgtgag ccacgaagac  
cctgaggtca agttcaactg gtacgtggac  
901 ggcgtggagg tgcataatgc caagacaaag  
ccgcgggagg agcagtacaa cagcacgtac  
961 cgtgtgggtca gcgtcctcac cgtcctgcac  
caggactggc tgaatggcaa ggagtacaag  
1021 tgcaagggtct ccaacaaagc cctcccagcc  
cccatcgaga aaaccatctc caaagccaaa

1081      gggcagcccc      gagaaccaca      ggtgtacacc  
 ctgcccccat cccgggagga gatgaccaag  
 1141      aaccaggtca      gcctgacctg      cctgggtcaaa  
 ggctttctatc ccagcgacat cgccgtggag  
 1201      tgggagagca      atgggcagcc      ggagaacaac  
 tacaagacca cgctcccgt gctggactcc  
 1261      gacggctcct      tcttcctcta      tagcaagctc  
 accgtggaca agagcaggtg gcagcagggg  
 1321      aacgtcttct      catgctccgt      gatgcatgag  
 gctctgcaca accactacac gcagaagagc  
 1381 ctctccctgt ccccgggtaa atga

**(10) Sequência de Proteína que Define a Região Variável da Cadeia Pesada de Extensão Completa de LRMR2B8HC Humanizado e a Região Constante da Cadeia Pesada de IgG1 Humana (Alótipo G1m(3)) (alelo 1) (sem sequência de sinal) (SEQ ID NO. 191)**

1      qvqlvqpgae      vkkpgtsvkl      sckasgytft  
 tywmhwvrqa pggglewige inptnghtny  
 61      nqkfqgratl      tvdkststay      melsslrsed  
 tavyycarny vgsifdywgq gtlitvssas  
 121      tkgpsvfpla      psskstsggt      aalgclvkdy  
 fpepvtvswn sgaltsgvht fpavllqssgl  
 181      yslssvvtvp      ssslgtqtyi      cnvnhkpsnt  
 kvdkrvepks cdkthtcppc papellggps  
 241      vflfppkpkd      tlmisrtpev      tcvvvdvshe  
 dpevkfnwyv dgvevhnakt kpreeqynst  
 301      yrvvsvltvl      hqdwlngkey      kckvsnkalp  
 apiektiska kgqprepvy tlppsreemt  
 361      knqvsltclv      kgfypsdiav      ewesngqpen  
 nykttppvld sdgsfflysk ltvdksrwqq  
 421 gnvfscsvmh ealhnhytqk slslspgk

**(11) Sequência de Ácido Nucléico que Codifica a Região Variável da**

**Cadeia Leve de LR2B8LC Humanizado (sequência de sinal sublinhada) (SEQ ID NO. 192)**

```

1      atggaaagtc      agacccttgt      attcatctct
attcttcttt ggttgtagtg agcagacggc
61      gacattgtga      tgaccaatc      ccccgatagt
atggccatga gtgtaggaga aagagtcacc
121     cttaattgca      aagcctccga      aaatgctcgtt
tcatatgtgt cttggtatca acaaaaacc
181     ggccaatcac      ccaaacttct      catatacggc
gcttcaaca gaaacacagg cgttcccgac
241     agatttagtg      gatccgatc      agctacagat
ttcaccctta ccatcagttc agttcaagca
301     gaagacggtg      cagactatca      ttgcggacaa
tcttataact acccttacac attcggacaa

```

**(12) Sequência de Proteína que Define a Região Variável da Cadeia Leve de LR2B8LC Humanizado (sem sequência de sinal) (SEQ ID NO. 193)**

```

1      divmtqspds      mamsvgervt      lnckasenvv
syvswyqqkp gqspklliyg asnrntgvpd
61      rfsgsgsatd      ftltissvqa      edvadyhcgq
synpytfgq gtkleik

```

**(13) Sequência de Ácido Nucléico que Codifica a Região Constante da Cadeia Capa Humana (alótipo Km(3)) (alelo 1) (SEQ ID NO. 194)**

```

1      gtacggtggc      tgcaccatct      gtcttcatct
tcccgccatc tgatgagcag ttgaaatctg
61      gaactgcctc      tgttgtgtgc      ctgctgaata
acttctatcc cagagaggcc aaagtacagt
121     ggaaggtgga      taacgccctc      caatcgggta
actcccagga gagtgtcaca gagcaggaca
181     gcaaggacag      cacctacagc      ctcagcagca
ccctgacgct gagcaaagca gactacgaga

```

241 aacacaaagt ctacgcctgc gaagtcaccc  
 atcagggcct gagctcgccc gtcacaaaga  
 301 gcttcaacag gggagagtgt tag

**(14) Sequência de Proteína que Define a Região Constante da Cadeia Capa Humana (alótipo Km(3)) (alelo 1) (SEQ ID NO. 195).** O primeiro aminoácido é derivado da tradução do último nucleotídeo da região variável e dos dois nucleotídeos do início da sequência da Cadeia Leve Capa.

1 rtvaapsvfi fppsdeqlks gtasvvc1ln  
 nfypreakvq wkvdnalqsg nsqesvteqd  
 61 skdstyslss tltlskadye khkvyacevt  
 hqglsspvtk sfnrgec

**(15) Sequência de Ácido Nucléico que Codifica a Região Variável da Cadeia Leve de Extensão Completa de LR2B8LC Humanizado e a Região Constante da Cadeia Capa Humana (alótipo Km(3)) (alelo 1) (SEQ ID NO. 196)**

1 atggaaagtc agacccttgt attcatctct  
attcttcttt ggttgatgg agcagacggc  
 61 gacattgtga tgacccaatc ccccgatagt  
 atggccatga gtgtaggaga aagagtcacc  
 121 cttaattgca aagcctccga aaatgtcggt  
 tcatatgtgt cttggtatca acaaaaaccc  
 181 ggccaatcac ccaaacttct catatacggc  
 gcttcaaaca gaaacacagg cgttcccgc  
 241 agatttagtg gatccggatc agctacagat  
 ttcaccctta ccatcagttc agttcaagca  
 301 gaagacggtg cagactatca ttgcggacaa  
 tcttataact acccttacac attcggacaa  
 361 ggaaccaaac tcgaaattaa acgtacgggtg  
 gctgcacccat ctgtcttcat cttcccgcga  
 421 tctgatgagc agttgaaatc tggaactgcc

tctgttgtgt gcctgctgaa taacttctat  
 481 cccagagagg ccaaagtaca gtggaagggtg  
 gataacgcc tccaatcggg taactcccag  
 541 gagagtgtca cagagcagga cagcaaggac  
 agcacctaca gcctcagcag caccctgacg  
 601 ctgagcaaag cagactacga gaaacacaaa  
 gtctacgcct gcgaagtcac ccatcagggc  
 661 ctgagctcgc ccgtcacaaa gagcttcaac  
 aggggagagt gttag

**(16) Sequência de Proteína que Codifica a Região Variável da Cadeia Leve de Extensão Completa de LR2B8LC Humanizado e a Região Constante da Cadeia Capa Humana (alótipo Km(3)) (alelo 1) (SEQ ID NO. 197)**

1 divmtqspds mamsvgervt lnckasenvv  
 syvswyqqkp gqspklliyg asnrntgvpd  
 61 rfsgsgsatd ftltiissvqa edvadyhcgq  
 synpytfgq gtkleikrtv aapsvfifpp  
 121 sdeqlksgta svvcllnnfy preakvqwkv  
 dnalqsgnsq esvteqdskd styslsstlt  
 181 lskadyekhk vyacevthqg lsspvtksfn rgec

**(17) Sequência de Ácido Nucléico que Codifica a Região Variável da Cadeia Leve de LRMR2B8LC Humanizado (sequência de sinal sublinhada) (SEQ ID NO. 198)**

1 atggaatccc aaacccttgt tttcatctct  
atccttctct ggctttatgg cgccgacgga  
 61 gacatcgtaa tgacacaatc cctgactct  
 cttgctatga gcttgggcga acgagtaaca  
 121 cttaactgca aagcatccga aaatgctgta  
 tcttacgtat cctggtatca gcaaaaacct  
 181 ggtcaaagtc ctaaacttct tatatatggg  
 gcaagtaatc gtgaaagtgg cgtcccagac



241 agatttagcg gttcaggttc agcaactgac  
 tttacactta caatttctag cgttcaggcc  
 301 gaagacgttg cagactatca ttgtggacaa  
 tcttataact atccttatac tttcggacaa  
 361 ggcactaaac ttgaaattaa ac

**(18) Sequência de Proteína que Define a Região Variável da Cadeia Leve de LRMR2B8LC Humanizado (sem sequência de sinal) (SEQ ID NO. 199)**

1 divmtqspds lamslgervt lnckasenvv  
 syvswyqqkp gqspklliyg asnresgvpd  
 61 rfsgsgsatd ftltissvqa edvadyhcgq  
 synpytfgq gtkleik

**(19) Sequência de Ácido Nucléico que Codifica a Região Variável da Cadeia Leve de Extensão Completa de LRMR2B8LC Humanizado e a Região Constante da Cadeia Capa Humana (alótipo Km(3)) (alelo 1) (sequência de sinal sublinhada) (SEQ ID NO. 200)**

1 atggaatccc aaacccttgt tttcatctct  
atccttctct ggctttatgg cgccgacgga  
 61 gacatcgtaa tgacacaatc ccctgactct  
 cttgctatga gcttgggcga acgagtaaca  
 121 cttaactgca aagcatccga aaatgtcgta  
 tcttacgtat cctggtatca gcaaaaacct  
 181 ggtcaaagtc ctaaacttct tatatatggt  
 gcaagtaatc gtgaaagtgg cgtcccagac  
 241 agatttagcg gttcaggttc agcaactgac  
 tttacactta caatttctag cgttcaggcc  
 301 gaagacgttg cagactatca ttgtggacaa  
 tcttataact atccttatac tttcggacaa  
 361 ggcactaaac ttgaaattaa acgtacggtg  
 gctgcaccat ctgtcttcat cttcccgcga  
 421 tctgatgagc agttgaaatc tggaactgcc

tctgttgtgt gcctgctgaa taacttctat  
 481 cccagagagg ccaaagtaca gtggaagggtg  
 gataacgcc tccaatcggg taactcccag  
 541 gagagtgtca cagagcagga cagcaaggac  
 agcacctaca gcctcagcag caccctgacg  
 601 ctgagcaaag cagactacga gaaacacaaa  
 gtctacgcct gcgaagtcac ccatcagggc  
 661 ctgagctcgc ccgtcacaaa gagcttcaac  
 aggggagagt gttag

**(20) Sequência de Proteína que Define a Região Variável da Cadeia Leve de Extensão Completa de LRMR2B8LC Humanizado e a Região Constante da Cadeia Capa Humana (alótipo Km(3)) (alelo 1) (SEQ ID NO. 201)**

1 divmtqspds lamslgervt lnckasenvv  
 syvswyqqkp gqspklliyg asnresgvpd  
 61 rfsgsgsatd ftltiissvqa edvadyhcgq  
 synpytfgq gtkleikrtv aapsvfifpp  
 121 sdeqlksgta svvcllnnfy preakvqwkv  
 dnalqsgnsq esvteqdskd styslsstlt  
 181 lskadyekhk vyacevthqg lsspvtksfn rgec

[000201] Para conveniência, a Tabela 14 fornece um quadro de concordância mostrando a correspondência entre as sequências de extensão completa e os anticorpos discutidos nesta seção com aqueles apresentados na Listagem de Sequência.

**TABELA 14**

SEQ. ID NO.	Proteína ou Ácido Nucléico
182	Região Variável da Cadeia Pesada de LR2B8HC– ácido nucléico
183	Região Variável da Cadeia Pesada de LR2B8HC– proteína
184	Região Constante da Cadeia Pesada de IgG1 Humana (Alótipo G1m(3)) (alelo 1) – ácido nucléico
185	Região Constante da Cadeia Pesada de IgG1 Humana (Alótipo G1m(3)) (alelo 1) – proteína
186	LR2B8HC + Constante de IgG1 (Alótipo G1m(3)) (alelo 1) – ácido nucléico

<b>SEQ. ID NO.</b>	<b>Proteína ou Ácido Nucléico</b>
187	LR2B8HC + Constante de IgG1 (Alótipo G1m(3)) (alelo 1) – proteína
188	LRMR2B8HC Região Variável da Cadeia Pesada – ácido nucléico
189	LRMR2B8HC Região Variável da Cadeia Pesada – proteína
190	LRMR2B8HC + Constante de IgG1 (Alótipo G1m(3)) (alelo 1) – ácido nucléico
191	LRMR2B8HC + Constante de IgG1 (Alótipo G1m(3)) (alelo 1) – proteína
192	Região Variável da Cadeia Leve de LR2B8LC – ácido nucléico
193	Região Variável da Cadeia Leve de LR2B8LC – proteína
194	Região Constante da Cadeia Capa Humana (Alótipo Km(3)) (alelo 1) – ácido nucléico
195	Região Constante da Cadeia Capa Humana (Alótipo Km(3)) (alelo 1) – proteína
196	LR2B8LC + Constante Capa (Alótipo Km(3)) (alelo 1) – ácido nucléico
197	LR2B8LC + Constante Capa (Alótipo Km(3)) (alelo 1) – proteína
198	Região Variável da Cadeia Leve de LRMR2B8LC – ácido nucléico
199	Região Variável da Cadeia Leve de LRMR2B8LC – proteína
200	LRMR2B8LC + Constante Capa (Alótipo Km(3)) (alelo 1) – ácido nucléico
201	LRMR2B8LC + Constante Capa (Alótipo Km(3)) (alelo 1) – proteína

[000202] A Tabela 15 resume as sequências de CDR da cadeia pesada (definição de Kabat) dos anticorpos 2B8 humanizados preparados pelo procedimento de humanização 1 e pelo procedimento de humanização 2 descritos acima neste Exemplo.

**TABELA 15**

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

A Tabela 16 resume as sequências de CDR da cadeia leve (definição de Kabat) dos anticorpos 2B8 humanizados preparados pelo procedimento de humanização 1 e pelo procedimento de humanização 2 descritos acima neste Exemplo

**TABELA 16**

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

### C. Afinidade de Ligação de Anticorpos 2B8 Humanizados

[000203] A afinidade de ligação ao antígeno e a cinética de interação foram analisadas por tecnologia de ressonância de plásmon de superfície usando um instrumento BIAcore T100. Imunoglobulinas anti-humano de camundongo (Jackson ImmunoResearch Labs, 209-005-098) foram imobilizadas em chips sensores de dextran carboximetilado CM4 (BIAcore, N° de catálogo BR-1005-34) por acoplamento de amina (BIAcore, N° de catálogo BR-1000-50) usando um protocolo de acoplamento usual de acordo com as recomendações do fabricante. As análises foram executadas a 25°C usando PBS (GIBCO, N° de catálogo 14040-133) contendo 0,05% de tensoativo P20 (BIAcore, N° de catálogo BR-1000-54), 2 mg/mL de BSA (EMD, N° de catálogo 2930) e 10 mg/mL de Sal de Sódio CM-Dextrano (Fluka, N° de catálogo 86524) como tampão de corrida.

[000204] Os anticorpos foram capturados em uma célula de fluxo individual em uma taxa de fluxo de 10  $\mu$ L/min. O tempo de injeção foi variável para cada anticorpo para produzir aproximadamente 20 RU de anticorpo capturado para cada ciclo. Tampão ou HGF (R&D Systems, N° de catálogo 294-HGN-025) diluído em tampão de corrida foi injetado sequencialmente sobre uma superfície de referência (nenhum anticorpo capturado) e sobre a superfície ativa (anticorpo a ser testado) por 2 minutos a 60  $\mu$ L/min. A fase de dissociação foi monitorada por 15 ou 90 minutos, dependendo da concentração. A superfície foi então regenerada com 10 mM de Glicina-HCl, pH 1,7 (BIAcore, N° de catálogo BR-1003-54) injetada por 3 minutos em uma taxa de fluxo de 60  $\mu$ L/min antes de outro ciclo ser iniciado. As concentrações de HGF testadas foram 1,88; 3,75 e 7,5 nM. A determinação dos parâmetros de cinética foi obtida usando a função de cinética do programa BIAevaluation com subtração da referência. Os parâmetros de cinética para cada anticorpo  $k_a$  (constante da taxa

de associação),  $k_d$  (constante da taxa de dissociação) e  $K_D$  (constante de dissociação de equilíbrio) estão resumidos na Tabela 8.

[000205] Os resultados resumidos na Figura 8 mostram que certas combinações de cadeias pesadas super-humanizadas (Hu2B8 Hv5a.1, Hu2B8 Hv5-51.1 ou Hu2B8 Hv1-f.1) e cadeias leves (Hu2B8 Kv1-39.1 ou Hu2B8 Kv3-15.1) retêm afinidade de ligação ( $K_D$ ) a HGF semelhante a 2B8 quimérico (regiões variáveis de camundongo com regiões constantes humanas) e 2B8 (Tabela 5).

#### D. Ensaio de ligação mutuamente exclusiva

[000206] A ligação mutuamente exclusiva a HGF foi avaliada por tecnologia de ressonância de plásmom de superfície usando um instrumento BIAcore T100. Imunoglobulinas anti-humanas de camundongo (Jackson ImmunoResearch Labs, 209-005-098) foram imobilizadas sobre chips sensores CM5 de dextran carboxiladometilado (BIAcore, Nº de catálogo BR-1006-68) por acoplamento de amina (BIAcore, Nº de catálogo BR-1000-50) usando um protocolo usual de acoplamento de acordo com as recomendações do fabricante. As análises foram realizadas a 25°C usando PBS (GIBCO, Nº de catálogo 14040-133) contendo 0,05% de tensoativo P20 (BIAcore, No. BR-1000-54), 2 mg/mL de BSA (EMD, Nº de catálogo 2930), e 10 mg/mL de Sal de Sódio CM-Dextrano (Fluka, Nº de catálogo 86524) como tampão de corrida.

[000207] Os anticorpos foram capturados em uma célula de fluxo individual em uma taxa de fluxo de 30  $\mu$ L/min. O tempo de injeção foi variável para cada anticorpo para produzir aproximadamente 150 RU de anticorpo capturado para cada ciclo. HGF (R&D Systems, Nº de catálogo 294-HGN-025) diluído em tampão de corrida em uma concentração final de 7,5  $\mu$ g/mL foi injetado por 90 segundos a 30  $\mu$ L/min sobre os anticorpos humanizados capturados. A ligação de HGF foi monitorada antes da injeção subsequente de anticorpo 2B8 de

camundongo ou anticorpo policlonal anti-HGF de cabra (R & D Systems, AF294) por 3 min a 30  $\mu$ L/min. A superfície foi então regenerada com 10 mM de Glicina-HCl pH 2,0 (BIAcore, N<sup>o</sup> de catálogo BR-1003-55) injetada por 3 min em uma taxa de fluxo de 60  $\mu$ L/min antes de outro anticorpo ser testado. Os resultados estão resumidos na Figura 9.

[000208] Os resultados resumidos na Figura 9 mostram que tanto os anticorpos 2B8 humanizados quanto os anticorpos 2B8 quiméricos impedem 2B8 de se ligar a HGF. Estes resultados demonstram que os anticorpos humanizados ainda se ligam ao mesmo epítipo de HGF que o anticorpo 2B8 original.

#### Exemplo 13 – Produção de Variantes Humanizadas de 2B8

##### a. ANTICORPOS HUMAN ENGINEERED®

[000209] Cadeias manipuladas leves (LR2B8LC e LRMR2B8LC, respectivamente) e pesadas (LR2B8HC and LRMR2B8HC, respectivamente) de baixo risco e de risco baixo-mais-moderado com otimização de códon e de expressão foram clonadas *in phase* em vetores de expressão de anticorpo transitório de XOMA, os quais contêm módulos de regiões constantes humanas Capa e Gama-1. As quatro variantes de 2B8 Human Engineered foram produzidas por transfecção transitória em células HEK293E. Os quatro anticorpos a seguir foram produzidos:

**HE2B8-1** = LR2B8HC (+ região constante de IgG1 (alótipo G1m(3) (alelo 1)) (SEQ ID NO. 187) mais LR2B8LC (+ região constante Capa (alótipo Km(3) (alelo 1))) (SEQ ID NO. 197)

**HE2B8-2** = LR2B8HC (+região constante de IgG1 (alótipo G1m(3) (alelo 1)) (SEQ ID NO. 187) mais LRMR2B8LC (+ Região constante Capa (alótipo Km(3) (alelo 1))) (SEQ ID NO. 201)

**HE2B8-3** = LRMR2B8HC (+ região constante de IgG1 (alótipo G1m(3) (alelo 1)) (SEQ ID NO. 191) mais LR2B8LC (+ Região constante Capa



(alótipo Km(3) (alelo 1))) (SEQ ID NO. 197)

**HE2B8-4** = LRMR2B8HC (+ região constante de IgG1 (alótipo G1m(3) (alelo 1)) (SEQ ID NO. 191) mais LRMR2B8LC (+ Região constante Capa (alótipo Km(3) (alelo 1))) (SEQ ID NO. 201)

[000210] As cadeias leves e pesadas foram co-transfectadas em células HEK293E adaptadas para suspensão de XOMA cultivadas em meio IS293 (Irvine Scientific, Irvine, CA) usando frascos de agitação de 2 litros. Após 24 horas nos frascos de agitação, 200 mL das células transfectadas foram centrifugadas, ressuspensas em 40 mL de meio fresco e transferidas para frascos Integra (Wilson Wolf Manufacturing Inc., MN) para produção. Após a incubação por sete dias, as suspensões celulares foram removidas dos frascos Integra, centrifugadas e os sobrenadantes das culturas retidos. Os anticorpos nos sobrenadantes das culturas foram purificados em colunas de rotação (spin) de proteína A (Pro-Chem), dialisados contra PBS, concentrados e esterilizados por filtração.

b. Anticorpos SUPERHUMANIZED®

[000211] cDNA de Hu2B8\_Hv5-51.1 de extensão completa + domínio constante de IgG1 humana (alótipo G1m(3)) foi clonado em pEE6.4 (Lonza Biologics, Berkshire, UK) usando sítios de restrição de HindIII e EcoRI. cDNA da região variável de Hu2B8\_Kv1-39.1 de extensão completa + domínio constante Capa humano e cDNA da região variável de Hu2B8\_Kv3-15.1 de extensão completa + domínio constante Capa humano foram clonados cada, em pEE14.4 (Lonza Biologics) usando sítios de restrição de HindIII e EcoRI. cDNA do promotor de hCMV-MIE + Hu2B8\_Hv5-51.1 de extensão completa + domínio constante de IgG1 humana (alótipo G1m(3)) + fragmento poli A de SV40 (em pEE6.4) foi removido por digestão com NotI/Sall e inserido no vetor pEE14.4 da cadeia Capa através dos sítios de NotI/Sall, criando assim 2 diferentes vetores de expressão que

expressam cada, simultaneamente, a cadeia pesada e a cadeia leve para fazer os seguintes anticorpos:

**sh2B8-9 (G1m(3))** = hu2B8 Hv5-51.1 (+ Região constante de IgG1 (alótipo G1m(3)) (alelo 2)) (SEQ ID NO. 210) mais hu2B8 Kv 1-39.1 (+ Região constante Capa (alótipo Km(3) (alelo 2))) (SEQ ID NO: 177)

**sh2B8-12 (G1m(3))** = hu2B8 Hv5-51.1 (+ Região constante de IgG1 (alótipo G1m(3)) (alelo 2)) (SEQ ID NO. 210) mais hu2B8 Kv 3-15.1 (+ Região constante Capa (Km(3) alótipo (alelo 2))) (SEQ ID No. 181)

[000212] As sequências de ácido nucléico codificantes e as sequências de proteína que definem a Região Constante da Cadeia Pesada de IgG1 Humana alótipo G1m(3) (alelo 2) e cada uma das sequência da cadeia pesada de extensão completa são descritas abaixo. As sequências da cadeia leve foram as mesmas que as descritas no Exemplo 12.

(1) Sequência de Ácido Codificante da Região Constante da Cadeia Pesada de IgG1 Humana (alótipo G1m(3)) (alelo 2) (SEQ ID NO. 207)

1	cctccaccaa	gggcccatcg	gtcttcccc
	tggcaccctc	ctccaagagc	acctctgggg
61	gcacagcggc	cctgggctgc	ctggtcaagg
	actacttccc	cgaaccggtg	acggtgtcgt
121	ggaactcagg	cgccctgacc	agcggcgtgc
	acaccttccc	ggctgtccta	cagtcctcag
181	gactctactc	cctcagcagc	gtggtgaccg
	tgccctccag	cagcttgggc	accagacct
241	acatctgcaa	cgtgaatcac	aagcccagca
	acaccaaggt	ggacaagaga	gttgagccca
301	aatcttgtga	caaaactcac	acatgcccac
	cgtgcccagc	acctgaactc	ctggggggac
361	cgtcagtctt	cctcttcccc	ccaaaacca
	aggacaccct	catgatctcc	cggaccctg
421	aggtcacatg	cgtggtggtg	gacgtgagcc

acgaagaccc tgagggtcaag ttcaactggt  
 481 acgtggacgg cgtggagggtg cataatgcca  
 agacaaagcc gcgggaggag cagtacaaca  
 541 gcacgtaccg tgtgggtcagc gtcctcaccg  
 tcctgcacca ggactgggctg aatggcaagg  
 601 agtacaagtg caaggtctcc aacaaagccc  
 tcccagcccc catcgagaag accatctcca  
 661 aagccaaagg gcagccccga gaaccacagg  
 tgtacaccct gcccccatcc cgggaggaga  
 721 tgaccaagaa ccagggtcagc ctgacctgcc  
 tgggtcaaagg cttctatccc agcgacatcg  
 781 ccgtggagtg ggagagcaat gggcagccgg  
 agaacaacta caagaccacg cctcccgtgc  
 841 tggactccga cggctccttc ttctctaca  
 gcaagctcac cgtggacaag agcagggtggc  
 901 agcaggggaa cgtcttctca tgctccgtga  
 tgcatgaggc tctgcacaac cactacacgc  
 961 agaagagcct ctccctgtct cgggtaaat ga

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

1 astkgpsvfp lapsskstsg gtaalgclvk  
 dyfpepvtvs wnsgaltsgv htfpavllqss  
 61 glyslssvvt vpssslgtqt yicnvnhkps  
 ntkvdkrvep kscdkthtcp pcpapellgg  
 121 psvflfppkp kdtlmisrtp evtcvvdvvs  
 hedpevkfnw yvdgvevhna ktkpreeqyn  
 181 styrvsvlt vlhqdwlngk eykckvsnka  
 lpapiektis kakgqprepq vytlppsree

241 mtknqvsltc lvkgfypsdi avewesngqp  
 ennykttppv ldsdgsffly skltvdksrw

301 qqgnvfscsv mhealhnhyt qkslslspgk

**(3) Sequência de Ácido Codificante da Cadeia de Extensão Completa que contém a Região Variável da Cadeia Pesada de Hu2B8 Hv5-51.1 Humanizado e a Região Constante da Cadeia Pesada de IgG1 Humana G1m(3) alótipo (alelo 2) (sequência de sinal sublinhada) (SEQ ID NO. 209)**

1 atggggtcaa ccgccatcct cgccctcctc  
ctggctgttc tccaaggagt ctgtgccgaa

61 gtgcagctgg tgcagtctgg agcagagggtg  
 aaaaagcccg gggagtctct gaagatctcc

121 tgtaagggtt ctggatacag ctttaccacc  
 tactggatgc actgggtgcg ccagatgccc

181 gggaaaggcc tggagtggat gggggagatt  
 aatcctacca acggtcatac taactacaat

241 ccgtccttcc aaggccaggt caccatctca  
 gctgacaagt ccatcagcac tgcctacctg

301 cagtggagca gcctgaaggc ctcggacacc  
 gccatgtatt actgtgcgag aaactatggt

361 ggtagcatct ttgactactg gggccaagga  
 accctgggtca ccgtctcctc agcctccacc

421 aagggcccat cggtcttccc cctggcacc  
 tcctccaaga gcacctctgg gggcacagcg

481 gccctgggct gcctgggtcaa ggactacttc  
 cccgaaccgg tgacgggtgtc gtggaactca

541 ggcgccctga ccagcggcgt gcacaccttc  
 ccggctgtcc tacagtctc aggactctac

601 tcctcagca gcgtgggtgac cgtgccctcc  
 agcagcttg gcacccagac ctacatctgc

661 aacgtgaatc acaagcccag caacaccaag

gtggacaaga gagttgagcc caaatcttgt  
 721 gacaaaactc acacatgccc accgtgccc  
 gcacctgaac tcctgggggg accgtcagtc  
 781 ttctcttcc ccccaaaacc caaggacacc  
 ctcatgatct cccggacccc tgaggtcaca  
 841 tgcgtggtgg tggacgtgag ccacgaagac  
 cctgaggtca agttcaactg gtacgtggac  
 901 ggcgtggagg tgcataatgc caagacaaag  
 ccgcgggagg agcagtacaa cagcacgtac  
 961 cgtgtggtca gcgtcctcac cgtcctgcac  
 caggactggc tgaatggcaa ggagtacaag  
 1021 tgcaaggtct ccaacaaagc cctcccagcc  
 cccatcgaga agaccatctc caagccaaa  
 1081 gggcagcccc gagaaccaca ggtgtacacc  
 ctgcccccat cccgggagga gatgaccaag  
 1141 aaccaggtca gcctgacctg cctggtcaaa  
 ggcttctatc ccagcgacat cgccgtggag  
 1201 tgggagagca atgggcagcc ggagaacaac  
 tacaagacca cgctcccgt gctggactcc  
 1261 gacggctcct tcttctctta cagcaagctc  
 accgtggaca agagcaggtg gcagcagggg  
 1321 aacgtcttct catgctccgt gatgcatgag  
 gctctgcaca accactacac gcagaagagc  
 1381 ctctccctgt ctccgggtaa atga

**(4) Sequência de Proteína que Define a Cadeia de Extensão Completa que contém Hu2B8 Hv5-51.1 Humanizado e a Região Constante da Cadeia Pesada de IgG1 Humana G1m(3) alótipo (alelo 2) (sem sequência de sinal) (SEQ ID NO. 210)**

1 evqlvqsgae vkkpgeslki sckgsgysft  
 tywmhwvrqm pgkglewmge inptnghtny  
 61 npsfqgqvti sadksistay lqwsslkasd

tamyycarny vgsifdywgq gtlvtvssas  
 121 tkgpsvfpla psskstsggt aalgclvkdy  
 fpepvtvswn sgaltsgvht fpavlgssgl  
 181 yslssvvtvp ssslgtqtyi cnvnhkpsnt  
 kvdkrvepks cdkthtcppc papellggps  
 241 vflfppkpkd tlmisrtpev tcvvvdvshe  
 dpevkfnwyv dgvevhnakt kpreeqynst  
 301 yrvvsvltvl hqdwlngkey kckvsnkalp  
 apiektiska kgqprepqvy tlppsreemt  
 361 knqvsltclv kgfypsdiav ewesngqpen  
 nykttppvld sdgsfflysk ltvdksrwqq  
 421 gnvfscsvmh ealhnhytqk slslspgk

[000213] Cada vetor de expressão duplo foi transfectado em células 293T para expressão transitória usando DMEM com 10% de soro fetal bovino. Quarenta e oito horas após a transfecção, as células foram lavadas com, e então substituídas por, meio livre de soro, IS GRO® (Irvine Scientific, Santa Ana, CA) contendo 4mM de L-Glutamina. O sobrenadante foi coletado diariamente e substituído por meio fresco por 10 dias. Os sobrenadantes da cultura foram centrifugados, filtrados (0,45 µm) e concentrados 10 a 100 vezes. Os anticorpos foram purificados em resina ProSep vA (Millipore), dialisados contra PBS, concentrados e esterilizados por filtração.

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

[000214] Os anticorpos humanizados produzidos no Exemplo 13 foram caracterizados quanto a sua habilidade de se ligar a hHGF e às proteínas HGF recombinantes produzidos na Exemplo 13.

[000215] Os anticorpos foram analisados por ressonância de plásmon de superfície usando um instrumento BIAcore T100 para avaliar sua habilidade de se ligar a hHGF e às proteínas de fusão

discutidas no Exemplo 3. Cada anticorpo foi imobilizado sobre um chip sensor de dextran carboximetilado CM5 (BIAcore, N° de catálogo BR-1006-68) por acoplamento de amina (BIAcore, N° de catálogo BR-1000-50) usando um protocolo de acoplamento usual de acordo com as instruções do fabricante.

[000216] As análises foram realizadas a 25°C usando PBS (GIBCO, N° de catálogo 14040-133) contendo 0,05% de tensoativo P20 (BIAcore, N° de catálogo R-1000-54), 2 mg/mL de BSA (EMD, N° de catálogo 2930) e 10 mg/mL de sal de sódio CM-Dextrano (Fluka, N° de catálogo 86524) como tampão de corrida. O sobrenadante contendo diferentes proteínas de fusão de HGF ou o sobrenadante de células transfectadas com o vetor vazio foi injetado sobre cada anticorpo em uma taxa de fluxo de 30 µL/min por 3 minutos. A ligação resultante foi determinada como unidades de ressonância (RU) sobre o limite basal 30 segundos após o final da injeção. A ligação foi comparada a HGF humano (R&D Systems, N° de catálogo 294-HGN-025) diluído em tampão de corrida. As ligações inespecíficas foram monitoradas por comparar a ligação a uma superfície de controle. Os resultados estão resumidos na Tabela 17.

**TABELA 17**

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

[000217] Os resultados na Tabela 17 demonstram que cada um dos anticorpos humanizados baseados em 2B8 se liga a rhHGF e a todas as três quimeras camundongo-humano-camundongo.

Exemplo 15 – Afinidades de Ligação de Variantes Humanizadas de

2B8

[000218] As afinidades de ligação e a cinética de interação dos anticorpos listados na Tabela 15 foram medidas por ressonância de plásmon de superfície.

[000219] Imunoglobulinas anti-humano de camundongo (Jackson Labs, N° de catálogo 209-005) foram imobilizadas em chips sensores de dextran carboximetilado CM4 (BIAcore, N° de catálogo BR-1006-68) por acoplamento de amina (BIAcore, N° de catálogo BR-1000-50) usando um protocolo de acoplamento usual de acordo com as instruções do fabricante. As análises foram realizadas a 25°C usando PBS (GIBCO, N° de catálogo 14040-133) contendo 0,05% de tensoativo P20 (BIAcore, N° de catálogo BR-1000-54), e 2 mg/mL de BSA (EMD, N° de catálogo 2930).

[000220] Os anticorpos foram capturados em uma célula de fluxo individual em uma taxa de fluxo de 10  $\mu$ L/min. O tempo de injeção foi variável para cada anticorpo para produzir aproximadamente 20 RU de anticorpo capturado para cada ciclo. Tampão ou HGF (R&D Systems, N° de catálogo 294-HGN-025) diluído em tampão de corrida foi injetado sequencialmente sobre uma superfície de referência (nenhum anticorpo capturado) e sobre a superfície ativa (anticorpo a ser testado) por 2 minutos a 60  $\mu$ L/min. A fase de dissociação foi monitorada por 15 ou 90 minutos, dependendo da concentração. A superfície foi então regenerada com 10 mM de Glicina-HCl, pH 1,7 (BIAcore, N° de catálogo BR-1003-54) injetada por 3 minutos em uma taxa de fluxo de 60  $\mu$ L/min antes de outro ciclo ser iniciado. As concentrações de HGF testadas foram 0,46 nM a 7,5 nM.

[000221] Os parâmetros de cinética foram determinados usando a função de cinética do programa BIAevaluation<sup>®</sup> com subtração da referência. Os parâmetros de cinética para cada anticorpo  $k_a$  (constante da taxa de associação),  $k_d$  (constante da taxa de



dissociação) e  $K_D$  (constante de dissociação de equilíbrio) estão resumidos na Tabela 18.

**TABELA 18**

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

[000222] Estes dados mostram que os anticorpos humanizados têm taxas de associação rápidas ( $k_a$ ), taxas de dissociação muito lentas ( $k_d$ ), e afinidades muito altas ( $K_D$ ). Em particular, os anticorpos têm afinidades que variam de 2,0 a 12 pM.

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

[000223] As afinidades de ligação e a cinética de interação dos anticorpos HE2B8-4, sh2B8-9, sh2B8-12, e 2B8 murino foram medidas por ressonância de plásmem de superfície sob diferentes condições.

[000224] Imunoglobulinas anti-humano de camundongo (Jackson Labs, N° de catálogo 209-005) ou imunoglobulinas anti-camundongo de coelho (BIAcore, N° de catálogo BR-1005-14) foram imobilizadas em chips sensores de dextran carboximetilado CM4 (BIAcore, N° de catálogo BR-1006-68) por acoplamento de amina (BIAcore, N° de catálogo BR-1000-50) usando um protocolo de acoplamento usual de acordo com as instruções do fabricante. No caso de medidas a 25°C para sh2b8-9 e sh2B8-12, um chip sensor CM5 (BIAcore, N° de catálogo BR-1006-68) foi usado. As análises foram realizadas a 25°C e 37°C usando PBS (GIBCO, N° de catálogo 14040-133) contendo 0,05% de tensoativo P20 (BIAcore, N° de catálogo BR-1000-54), e 2 mg/mL de BSA (EMD, N° de catálogo 2930) como tampão de corrida.

[000225] Os anticorpos foram capturados em uma célula de fluxo individual em uma taxa de fluxo de 10  $\mu$ L/min. O tempo de injeção foi variável para cada anticorpo para produzir aproximadamente 20 RU de

anticorpo capturado para cada ciclo. Tampão ou HGF (R&D Systems, N° de catálogo 294-HGN-025) diluído em tampão de corrida foi injetado sequencialmente sobre uma superfície de referência (nenhum anticorpo capturado) e sobre a superfície ativa (anticorpo a ser testado) por 2 minutos a 60  $\mu\text{L}/\text{min}$ . A fase de dissociação foi monitorada por 15 ou 90 minutos, dependendo da concentração. A superfície dos chips sensores de imunoglobulinas de camundongo anti-humano foi então regenerada com 10 mM de Glicina-HCl, pH 2,2 (BIAcore, N° de catálogo BR-1003-54) injetada por 3 minutos em uma taxa de fluxo de 60  $\mu\text{L}/\text{min}$  antes de outro ciclo ser iniciado. A superfície dos chips sensores de imunoglobulinas de coelho anti-camundongo foi então regenerada com 10 mM de Glicina-HCl, pH 1,7 (BIAcore, N° de catálogo BR-1003-54) injetada por 3 minutos em uma taxa de fluxo de 60  $\mu\text{L}/\text{min}$  antes de outro ciclo ser iniciado. As concentrações de HGF testadas foram 0,46 nM a 7,5 nM.

[000226] Os parâmetros de cinética foram determinados usando a função de cinética do programa BIAevaluation com subtração da referência. Os parâmetros de cinética para cada anticorpo,  $k_a$  (constante da taxa de associação),  $k_d$  (constante da taxa de dissociação) e  $K_D$  (constante de dissociação de equilíbrio) estão resumidos na Tabela 19.

**TABELA 19**

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

[000227] Conforme esperado, as constantes da taxa de associação aumentaram com um aumento na temperatura. De forma surpreendente, as constantes de dissociação não mudaram

significativamente com um aumento correspondente na temperatura. Consequentemente, as constantes de dissociação de equilíbrio gerais ( $K_D$ ) foram aproximadamente 1,4 a 3 vezes menores (maior afinidade) em temperatura fisiológica (37°C).

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

[000228] Os anticorpos descritos no Exemplo 14 foram caracterizados quanto a sua habilidade de (a) inibir a ligação de hHGF a c-Met, e (b) inibir a incorporação de BrdU estimulada por HGF em células 4MBr-5.

[000229] O Ensaio de Inibição da Ligação HGF-Met (Ensaio de Neutralização) foi realizado como descrito a seguir. Os anticorpos foram testados por ELISA quanto a sua habilidade de inibir a ligação de hHGF a c-Met. Especificamente, placas de ensaio DELFIA de 96 cavidades Wallac (Wallac Inc., N° de catálogo AAAND-0001) foram revestidas com 100 µL de HGF a 6,25 µg/mL (R&D Systems, N° de catálogo 294-HGN-025) em tampão de revestimento de carbonato (15 mM de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  e 34 mM de  $\text{NaHCO}_3$ , pH 9,0) por 16 horas a 4°C. As placas foram então bloqueadas com 200 µL de leite em pó desnatado a 5% em PBS por 1 hora em temperatura ambiente. Os anticorpos foram preparados em uma placa separada por adicionar concentrações crescentes dos anticorpos sob investigação (0,033 a 250 nM, diluição seriada de 2 vezes) a 2 nM de c-Met biotinilado em leite em pó desnatado a 5% em PBS. C-Met (R&D Systems, N° de catálogo 358-MT/CF) é biotinilado de acordo com as instruções do fabricante em uma proporção de biotina para c-Met de 10:1. 100 µL de amostra por cavidade foram transferidos para a placa de ensaio e incubados por 2 horas em temperatura ambiente. As placas resultantes foram lavadas três vezes com PBS-0,1% de Tween 20, e incubadas por 1 hora em temperatura ambiente com Estreptavidina

marcada com Eu (Wallac, N° de catálogo 1244-360) diluída 1:1000 em tampão de ensaio DELFIA (Wallac, N° de catálogo 4002-0010). As placas resultantes foram lavadas 3 vezes com solução de lavagem DELFIA (Wallac, N° de catálogo 4010-0010) e incubadas com 100  $\mu$ L/cavidade de solução de intensificação DELFIA (Wallac #4001-0010) por 15 minutos em temperatura ambiente com agitação. As placas foram lidas em um instrumento Victor<sup>3</sup>V (Perkin Elmer) usando o método de Európio. Os valores de IC<sub>50</sub> foram calculados e estão resumidos na Tabela 6.

Os valores de IC<sub>50</sub> obtidos são mostrados na Tabela 20.

**TABELA 20**

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

[000230] Estes resultados da Tabela 20 demonstram que os anticorpos humanizados testados neutralizaram eficazmente a ligação de HGF a c-Met.

[000231] Os anticorpos na Tabela 17 também foram testados no ensaio de proliferação celular descrito no Exemplo 7(b). Os resultados estão resumidos na Tabela 21.

**TABELA 21**

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

[000232] Os resultados da Tabela 21 demonstram que todos os anticorpos humanizados testados inibiram a proliferação induzida por

HGF em células 4MBr-5.

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

[000233] Os anticorpos na Tabela 17 foram testados no ensaio antidispersão descrito no Exemplo 8. Os resultados estão resumidos abaixo na Tabela 22.

TABELA 22

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

- Nenhuma Inibição

+++ Inibição muito forte, quase completa inhibition

++ Inibição forte

+ Inibição detectável

[000234] Os resultados na Tabela 22 demonstram que todos os anticorpos humanizados testados inibiram a dispersão induzida por HGF na mesma extensão que o anticorpo monoclonal murino 2B8.

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

[000235] Os anticorpos na Tabela 17 foram testados no ensaio de fosforilação de c-Met descrito no Exemplo 9. Os resultados estão resumidos abaixo na Tabela 23.

TABELA 23

Anticorpo	Média de dois testes	Desvio Padrão
2B8	0,91	0,02
he2B8-1	0,80	0,04
he2B8-2	0,88	0,15
he2B8-3	0,79	0,05
he2B8-4	0,75	0,14
sh2B8-9 (G1m(3))	0,93	0,03
sh2B8-12 (G1m(3))	0.81	0.07

[000236] Os resultados na Tabela 23 demonstram que todos os anticorpos humanizados testados são potentes inibidores da fosforilação de c-Met induzida por HGF em células PC-3.

Exemplo 20 – Inibição tumoral em Modelo de Xenoenxerto de U87MG

[000237] A habilidade dos anticorpos monoclonais humanizados da invenção inibirem o crescimento tumoral foi testada em um modelo de xenoenxerto de U87MG. Células U87MG (ATCC) foram expandidas em cultura a 37°C em uma atmosfera contendo 5% de CO<sub>2</sub> e 95% de ar, usando um meio que compreende meio de Eagle Modificado por Dulbecco (DMEM) com 10% de soro fetal bovino, 100 unidades/mL de penicilina e 100 µg/mL de estreptomicina. As células foram subcultivadas e mantidas por desprender as células da parede da placa de cultura usando tripsina-EDTA.

[000238] Células quase confluentes foram coletadas por tripsinização e então 5 x 10<sup>6</sup> células em Matrigel 50% (BD Biosciences; N° de catálogo 356237) foram injetadas subcutaneamente na área dorsal superior entre a escápula de camundongos ICR SCID fêmeas de 7 semanas de idade (Taconic Labs). Os diâmetros (mm) mais longos (L) e mais curtos (W) dos tumores foram medidos com um compasso de calibre. O volume tumoral (vol) foi calculado como: (mm<sup>3</sup>) = L x W<sup>2</sup> / 2. Quando os tumores cresceram para aproximadamente 200 mm<sup>3</sup>, os camundongos que possuíam os tumores foram randomizados em 5 grupos de 10 camundongos cada. Um grupo recebeu PBS e um grupo recebeu controle com IgG. Cada um dos outros 4 grupos recebeu um dos anticorpos humanizados (HE2B8-1, HE2B8-2, HE2B8-3, e HE2B8-4). Todos os anticorpos foram administrados em doses de 0,25 mg/kg de peso corporal, duas vezes por semana, por injeções intraperitoneais de 5 doses. Os volumes tumorais e os pesos corporais dos camundongos foram registrados duas vezes por semana. A inibição do crescimento tumoral foi analisada usando o teste de t-

Student.

[000239] Os anticorpos humanizados testados eram ativos *in vivo*. Houve uma inibição do crescimento do tumor de 57% tumor para HE2B8-1 com um valor de p de 0,02, 61% de inibição do crescimento do tumor para HE2B8-2 com um valor de p de 0,02, 85% de inibição do crescimento do tumor para HE2B8-3, com um valor de p de 0,0004, e 74% de inibição do crescimento do tumor para HE2B8-4 com um valor d p de 0,001. Nenhuma perda corporal significativa foi observada.

[000240] Um estudo subsequente foi realizado como descrito acima em camundongos nude NCR fêmeas com tumores de U87MG subcutâneos inoculados no flanco. Cada (10 camundongos cada) recebeu um dos seguintes tratamentos a 0,5 mg/kg: controle com veículo de PBS, controle de hulgG, HE2B8-4, ou sh2B8-9. O tratamento foi dado intra-peritonealmente duas vezes por semana por um mínimo de 5 semanas. Cada grupo de tratamento demonstrou regressão tumoral similar com inibição do crescimento do tumor de 113% para sh2B8-9 e 115% para HE2B8-4, e um retardo mínimo do crescimento do tumor de 30 dias. Ambos os tratamentos foram bem tolerados sem perdas corporais significativas.

#### INCORPORAÇÃO POR REFERÊNCIA

[000241] A descrição completa de cada um dos documentos de patente e artigos científicos referidos aqui está incorporada por referência para todos os propósitos.

#### EQUIVALENTES

[000242] A invenção ser concretizada em outras formas específicas sem se afastar do espírito ou características essenciais desta. As modalidades anteriores são, portanto para serem consideradas, em todos os aspectos, como ilustrativas ao invés de limitantes da invenção aqui descrita. O escopo da invenção é indicado assim pelas

reivindicações anexas e não pela descrição anterior, e todas as alterações que se encontram dentro do significado e amplitude de equivalência das reivindicações são pretendidas para serem abrangidas nela.



## REIVINDICAÇÕES

1. Proteína de ligação isolada que se liga ao fator de crescimento de hepatócito humano (HGF), caracterizada pelo fato de que compreende:

(a) uma região variável da cadeia pesada de imunoglobulina que compreende a estrutura CDR<sub>H1</sub>-CDR<sub>H2</sub>-CDR<sub>H3</sub>, em que

(i) CDR<sub>H1</sub> compreende a seqüência de aminoácidos SEQ ID NO: 15 ,

(ii) CDR<sub>H2</sub> compreende uma seqüência de aminoácidos selecionada dentre o grupo que consiste em SEQ ID NO: 204 e SEQ ID NO: 205e

(iii) CDR<sub>H3</sub> compreende uma seqüência de aminoácidos SEQ ID NO: 17; e

(b) uma região variável da cadeia leve de imunoglobulina compreendendo a estrutura CDR<sub>L1</sub>-CDR<sub>L2</sub>-CDR<sub>L3</sub>, em que

(i) CDR<sub>L1</sub> compreende a seqüência de aminoácidos SEQ ID NO: 18,

(ii) CDR<sub>L2</sub> compreende uma seqüência de aminoácidos selecionada dentre o grupo que consiste em SEQ ID NO:19 e SEQ ID NO: 206 e

(iii) CDR<sub>L3</sub> compreende uma seqüência de aminoácidos SEQ ID NO: 20,

em que a região variável da cadeia pesada de imunoglobulina e a região variável da cadeia leve de imunoglobulina juntas definem um sítio de ligação único para ligação a HGF humano.

2. Proteína de ligação, de acordo com a reivindicação 1, caracterizada pelo fato de que a região variável da cadeia pesada de imunoglobulina compreende a estrutura CDR<sub>H1</sub>-CDR<sub>H2</sub>-CDR<sub>H3</sub>, em que

(i) CDR<sub>H1</sub> compreende a sequênciade aminoácido SEQ ID

NO. 15,

(ii) CDR<sub>H2</sub> compreende a sequência de aminoácido SEQ ID NO. 205, e

(iii) CDR<sub>H3</sub> compreende a sequência de aminoácido SEQ ID NO. 17,

e a região variável da cadeia leve de imunoglobulina compreende a estrutura CDR<sub>L1</sub>-CDR<sub>L2</sub>-CDR<sub>L3</sub>, em que

(i) CDR<sub>L1</sub> compreende a sequência de aminoácido SEQ ID NO. 18,

(ii) CDR<sub>L2</sub> compreende a sequência de aminoácido SEQ ID NO. 206, e

(iii) CDR<sub>L3</sub> compreende a sequência de aminoácido SEQ ID NO. 20.

3. Proteína de ligação, de acordo com a reivindicação 1 ou 2, caracterizada pelo fato de que as sequências da região de determinação de complementaridade (CDR) estão interpostas entre regiões estruturais da imunoglobulina humana ou humanizada.

4. Proteína de ligação, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 3, caracterizada pelo fato de que a proteína de ligação é um anticorpo ou um fragmento de ligação ao antígeno do mesmo.

5. Proteína de ligação, de acordo com a reivindicação 4, caracterizada pelo fato de que a proteína de ligação é um anticorpo monoclonal.

6. Ácido nucléico isolado, caracterizado pelo fato de que compreende uma seqüência de nucleotídeos que codifica uma região variável da cadeia leve de imunoglobulina como definida em qualquer uma das reivindicações 2 a 5.

7. Ácido nucléico isolado, caracterizado pelo fato de que compreende uma seqüência de nucleotídeos que codifica a região

variável da cadeia pesada de imunoglobulina como definida em qualquer uma das reivindicações 1 a 5.

8. Vetor de expressão, caracterizado pelo fato de que compreende a seqüência de ácido nucléico como definida na reivindicação 6 e/ou 7.

9. Célula hospedeira, caracterizada pelo fato de que compreende pelo menos um vetor de expressão que codifica uma região variável da cadeia pesada e/ou leve de imunoglobulina como definida em qualquer uma das reivindicações 2 a 5, em que a célula hospedeira é um microrganismo transgênico ou um hibridoma.

10. Método para produzir um polipeptídeo que compreende uma região variável da cadeia pesada de imunoglobulina, caracterizado pelo fato de que compreende:

(i) cultivar a célula hospedeira como definida na reivindicação 9 sob condições tais que a célula hospedeira expresse o polipeptídeo que compreende a região variável da cadeia pesada de imunoglobulina; e

(ii) purificar o polipeptídeo que compreende a região variável da cadeia pesada de imunoglobulina.

11. Método para produzir um polipeptídeo compreendendo uma região variável da cadeia leve de imunoglobulina, caracterizado pelo fato de que compreende:

(i) cultivar a célula hospedeira como definida na reivindicação 9 sob condições tais que a célula hospedeira expresse o polipeptídeo compreendendo a região variável da cadeia leve de imunoglobulina; e

(ii) purificar o polipeptídeo compreendendo a região variável da cadeia leve de imunoglobulina.

12. Proteína de ligação isolada, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 5, caracterizada pelo fato de que se liga ao

fator de crescimento de hepatócito humano com um  $k_d$  de  $4,0 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$  ou menos.

13. Proteína de ligação isolada, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 5, caracterizada pelo fato de que se liga ao fator de crescimento de hepatócito humano com um  $K_D$  de 20 pM ou menos.

14. Proteína de ligação, de acordo com a reivindicação 1, caracterizada pelo fato de que se liga ao fator de crescimento de hepatócito humano (HGF) e compreende uma região variável da cadeia leve de imunoglobulina e uma região variável da cadeia pesada de imunoglobulina selecionadas a partir do grupo que consiste em:

(a) uma região variável da cadeia leve de imunoglobulina que compreende a sequência de aminoácido de SEQ ID NO. 193, e uma região variável da cadeia pesada de imunoglobulina que compreende a sequência de aminoácido de SEQ ID NO. 183;

(b) uma região variável da cadeia leve de imunoglobulina que compreende a sequência de aminoácido de SEQ ID NO. 193, e uma região variável da cadeia pesada de imunoglobulina que compreende a sequência de aminoácido de SEQ ID NO. 189;

(c) uma região variável da cadeia leve de imunoglobulina que compreende a sequência de aminoácido de SEQ ID NO. 199, e uma região variável da cadeia pesada de imunoglobulina que compreende a sequência de aminoácido de SEQ ID NO. 183; e

(d) uma região variável da cadeia leve de imunoglobulina que compreende a sequência de aminoácido de SEQ ID NO. 199, e uma região variável da cadeia pesada de imunoglobulina que compreende a sequência de aminoácido de SEQ ID NO. 189.

15. Proteína de ligação, de acordo com a reivindicação 14, caracterizada pelo fato de que a região variável da cadeia leve de imunoglobulina compreende a sequência de aminoácido de SEQ ID

NO.199, e a região variável da cadeia pesada de imunoglobulina compreende a sequência de aminoácido de SEQ ID NO. 189.

16. Proteína de ligação, de acordo com a reivindicação 1, caracterizada pelo fato de que se liga ao fator de crescimento de hepatócito humano (HGF) e compreende uma sequência de cadeia leve de imunoglobulina e uma sequência de cadeia pesada de imunoglobulina selecionadas a partir do grupo que consiste em:

(a) uma sequência de cadeia leve de imunoglobulina que compreende a sequência de aminoácido de SEQ ID NO. 197, e uma sequência de cadeia pesada de imunoglobulina que compreende a sequência de aminoácido de SEQ ID NO. 187;

(b) uma sequência de cadeia leve de imunoglobulina que compreende a sequência de aminoácido de SEQ ID NO. 197, e uma sequência de cadeia pesada de imunoglobulina que compreende a sequência de aminoácido de SEQ ID NO. 191;

(c) uma sequência de cadeia leve de imunoglobulina que compreende a sequência de aminoácido de SEQ ID NO. 201, e uma sequência de cadeia pesada de imunoglobulina que compreende a sequência de aminoácido de SEQ ID NO. 187; e

(d) uma sequência de cadeia leve de imunoglobulina que compreende a sequência de aminoácido de SEQ ID NO. 201, e uma sequência de cadeia pesada de imunoglobulina que compreende a sequência de aminoácido de SEQ ID NO. 191.

17. Proteína de ligação, de acordo com a reivindicação 16, caracterizada pelo fato de que a cadeia leve da imunoglobulina compreende a sequência de aminoácido de SEQ ID NO. 201, e a cadeia pesada de imunoglobulina compreende a sequência de aminoácido de SEQ ID NO. 191.

18. Uso da proteína de ligação como definida em qualquer uma das reivindicações 1 a 5 ou 14 a 17, caracterizado pelo fato de

que é na preparação de um medicamento para uso na inibição ou redução da proliferação de uma célula tumoral, e/ou inibição do crescimento de tumor em um mamífero, e/ou tratamento de um tumor em um mamífero.

19. Método de produzir uma proteína de ligação que se liga ao fator de crescimento de hepatócito humano (HGF), que é um anticorpo intacto, tal como um anticorpo monoclonal, ou um fragmento de ligação ao antígeno deste, caracterizado pelo fato de que compreende:

(i) cultivar a célula hospedeira como definida na reivindicação 9 sob condições tais que a célula hospedeira expressa um polipeptídeo que compreende a região variável da cadeia pesada de imunoglobulina e um polipeptídeo que compreende a região variável da cadeia leve de imunoglobulina; e

(ii) purificar o anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno do anticorpo.

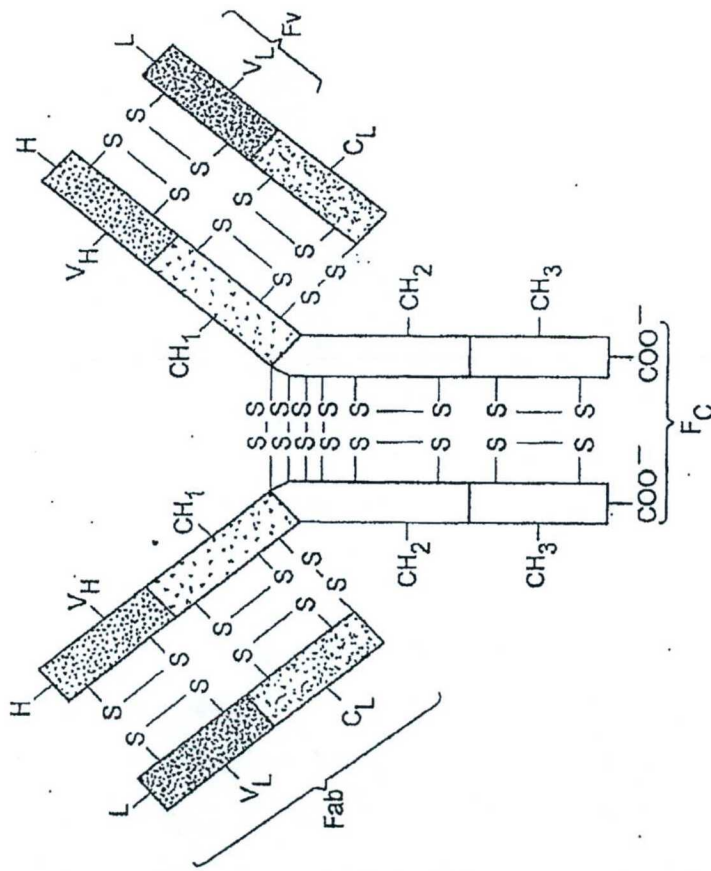


FIG. 1

Alinhamentos dos Aminoácidos da Região Variável da Cadeia Pesada Completa

Anticorpo	Peptídeo de sinal	CDR1	CDR2
1A3	MFNGRLIFLVVLKGVKCEVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASEFTFSYYSWVRQTPFKELQWVAIISPGGGSSYPASVKGGRFTISRDNAKNTILYL		
2B8	MGWSYIILFAVATAIDVRSQVQLAQQGAEELVKRPGTSVKLSCKASGYTFITVMHMYNQRFQGGLEWLGELNPTNGHTININEKEYSKATLTVDKSSSTAYM		
2F8	MEWSVLEFLLSVITAGVHCQVQLKQSGAEELVRFPGTSVMSCKASGYTFITYYLHMYNQRFQGGLEWLGKLPGGSSGTYINEMFKLKATLTVDTSSSTAYM		
3B6	MEWPCIEFLLSVITAGVHSQVQLQQSGAEELVRFPGTSVMSCKASGYTFISYRMSWVQRFGQGLWLGQIYFPGDSDNYNGNFKGKATLFDADKSSSTAYM		
3D11	MAVFLVFLCLVAFPCVLSQVQLKESGFLVAPQSLSITCTVSGFSLISYSLHWVRPPGKGLWLGWAG-GNTNYSLSLMSRLTIRKDNKSQVEL		
1D3	MFNGRLIFLVVLKGVKCEVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFSDIYMSWVRQTPFKELWVAIISGGGGSTIYPPDSVKGGRFTISRDNAKNTILYL		
1F3	MNFGRLIFLVVLKGVKCEVQLVESGGGLVQSGSLKLSCAASGFTFSNIFMSWVRQTPFKELWVAIISGGGGSTIYPPDSVKGGRFTISRDNAKNTILYL		
3A12	MNFGRLIFLVVLKGVKCEVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFSYFMSWVRQTPFKELWVAIISGGGGSTIYPPDSVKGGRFTISRDNAKNTILYL		

CDR3

(1A3 cont.)	QMSLSKSEDTAMYICARQGDYGDYAMDYWGQGTSTVTVSS (SEQ ID NO: 2)
(2B8 cont.)	QLSSLTSEDSAVYICARNY-----VGSIFDYGQGTLLTVSS (SEQ ID NO: 12)
(2F8 cont.)	QLSSLTSDSDSAVYICARNG-----LKGFDYWGQGTLLTVSS (SEQ ID NO: 22)
(3B6 cont.)	QLSSLTSEDSAVYICASQIG--LRENYFDYWGQGTLLTVSS (SEQ ID NO: 32)
(3D11 cont.)	KMNSLQITDDTAMYICARER-----FAYWGQGTLLTVSA (SEQ ID NO: 42)
(1D3 cont.)	QMSLSKSEDTAMYICVRQGDYGDYAMDYWGQGTSTVTVSS (SEQ ID NO: 52)
(1F3 cont.)	QMSLSKSEDTAMYICVRQGDYGDYAMDYWGQGTSTVTVSS (SEQ ID NO: 62)
(3A12 cont.)	QMNSLKSEDTAMYICVRQGDYGDYAMDYWGQGTSTVTVSS (SEQ ID NO: 72)

FIG. 2



Alinhamentos dos Aminoácidos da CDR da Cadeia Pesada

Anticorpo	CDR1	CDR2	CDR3
1A3	NYLMS (SEQ ID NO: 5)	YISPGGSSVYPAASVKG (SEQ ID NO: 6)	QGDGYGDYAMDY (SEQ ID NO: 7)
2B8	TYNMH (SEQ ID NO: 15)	EINPTNGHTNYNEKFKS (SEQ ID NO: 16)	NY----VGSIEDY (SEQ ID NO: 17)
2P8	TYVTH (SEQ ID NO: 25)	KIGPGSGTYNEMFKD (SEQ ID NO: 26)	RG----LGRGFDY (SEQ ID NO: 27)
3B6	SYWMN (SEQ ID NO: 35)	QIYFGDSDNYNGNFKG (SEQ ID NO: 36)	QIG--LRENYFDY (SEQ ID NO: 37)
3D11	SYSLH (SEQ ID NO: 45)	VIWAG-GNTNYNSLMS (SEQ ID NO: 46)	ER-----PAY (SEQ ID NO: 47)
1D3	DYXMS (SEQ ID NO: 55)	YISSGGSTIYDPSVKG (SEQ ID NO: 56)	QGDGYGDYAMDY (SEQ ID NO: 57)
1P3	NYFMS (SEQ ID NO: 65)	YISSGGSTIYDPSVKG (SEQ ID NO: 66)	QGDGYGDYAMDY (SEQ ID NO: 67)
3A12	NYFMS (SEQ ID NO: 75)	YISSGGSTIYDPSVKG (SEQ ID NO: 76)	QGDGYGDYAMDY (SEQ ID NO: 77)

FIG. 3

Alinhamentos dos Aminoácidos da Região Variável da Cadeia Leve (Kappa) Completa

Anticorpo	Peptídeo de sinal	CDR1	CDR2
1A3	--MSVPTQVLGILLWLTDRCDIQMTQSPASLSVSVGETVITTCRASENIV-----SNLAWYQQKQKSPQLLVVAATNLADGVPSRFSGSGSGTQFSLK		
2B8	--MESQTLVFIISILLWLYGADGNIWMTQSPKSMMSVGERVTLSQKASENVV-----SYVSWYQQKPAQSPKLLLYGASNRNTGVDPDRFTGSGSADFTILT		
2F8	--METDTILLWVILLWVPGSTGDIVLTQSPASLAVSLGQRATISCKASQSDVDYDGNYSYINWYQQKPGQPPKVLVYVASNLESQIPARFSGSGSGTDFTLN		
3B6	MDMRTRACFLGILLWVPGIKQDIKMTQSPSMYASLGERVTITCKASQDIK-----SYLSWYQQKPGKSPKTLIYEVNRLVDGVPSRFSGSGSGDSSLT		
3D11	MDFQVQIFSFILLISASVKLSRQIVLTQSPAINSAVFGEEKVTMTCPASSSVS-----YMLWYQQKSGTSPKRWLYDTSKLASGVPARFSGSGSGTYSILT		
1D3	--MSVPTQVLGILLWLTDRCDIQMTQSPASLSVSVGETVITTCRASENIV-----SNLAWYQQKQKSPQLLVVAATNLADGVPSRFSGSGSGTQFSLK		
1F3	--MSVPTQVLGILLWLTDRCDIQMTQSPASLSVSVGETVITTCRASENIV-----SNLAWYQQKQKSPQLLVVDATHLPDGVPSRFSGSGSGTQFSLK		
3A12	--MSVPTQVLGILLWLTDRCDIQMTQSPASLSVSVGETVITTCRASENIV-----INLAWYQQKQKSPQLLVVAATNLADGVPSRFSGSGSGTQFSLK		

CDR3

(1A3 cont.)	INLQSEDFGTYCYQHFWGTPYTFGGGTKLEIK (SEQ ID NO: 4)
(2B8 cont.)	ISSVRAEDLADYHCQGSYNYPTFFGGGTRLEIK (SEQ ID NO: 14)
(2F8 cont.)	IHPVEEDAATYCCQCSIEDPPTFGAGTKLEIK (SEQ ID NO: 24)
(3B6 cont.)	ITSLNEDMGTYCYQLOYDEFFPTFFGGGTKLEIK (SEQ ID NO: 34)
(3D11 cont.)	ISSMEAEADAATYCCQWSSNPLTFGAGTKLEIK (SEQ ID NO: 44)
(1D3 cont.)	INLQSEDFGRYCYQHFWGTPYTFGGGTKLEIK (SEQ ID NO: 54)
(1F3 cont.)	INLQSEDFGSYCYQHFWGTPYTFGGGTRLEIK (SEQ ID NO: 64)
(3A12 cont.)	INLQSEDFGSYCYQHFWGTPYTFGGGTKLEIK (SEQ ID NO: 74)

FIG. 4

## Alinhamentos dos Aminoácidos da CDR da Cadeia Leve (Kappa)

Anticorpo	CDR1	CDR2	CDR3
1A3	RASENIY-----SNLA (SEQ ID NO: 8)	AATNLD (SEQ ID NO: 9)	QHFWGTPYT (SEQ ID NO: 10)
1D3	RISENIY-----SNLA (SEQ ID NO: 58)	AATNLD (SEQ ID NO: 59)	QHFWGTPYT (SEQ ID NO: 60)
2B8	KASENVV-----SYVS (SEQ ID NO: 18)	GASNRNT (SEQ ID NO: 19)	QGSYNYPT (SEQ ID NO: 20)
2F8	KASQSVYDGNYSYIN (SEQ ID NO: 28)	VASNLES (SEQ ID NO: 29)	QQSIEDPPT (SEQ ID NO: 30)
3D11	SASSSVS-----YMH (SEQ ID NO: 48)	DYSKLAS (SEQ ID NO: 49)	QOWSSNPLT (SEQ ID NO: 50)
3B6	KASQDIK-----SYLS (SEQ ID NO: 38)	RVNRLLVD (SEQ ID NO: 39)	LOYDEFPPT (SEQ ID NO: 40)
1F3	RASENIY-----SNLA (SEQ ID NO: 68)	DATHLPD (SEQ ID NO: 69)	QHFWGTPYT (SEQ ID NO: 70)
3A12	RASENIY-----INLA (SEQ ID NO: 78)	AATKLD (SEQ ID NO: 79)	QHFWGTPYT (SEQ ID NO: 80)

FIG. 5

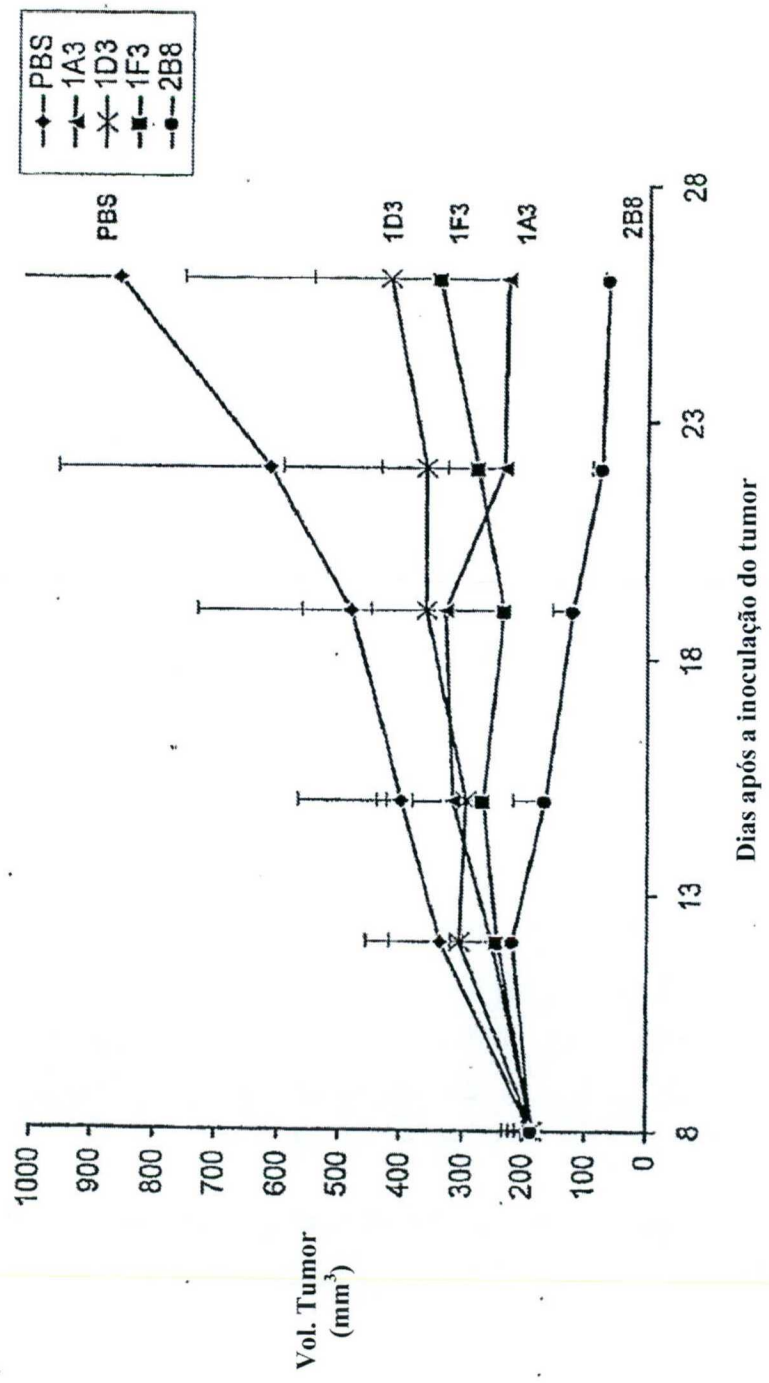


FIG. 6

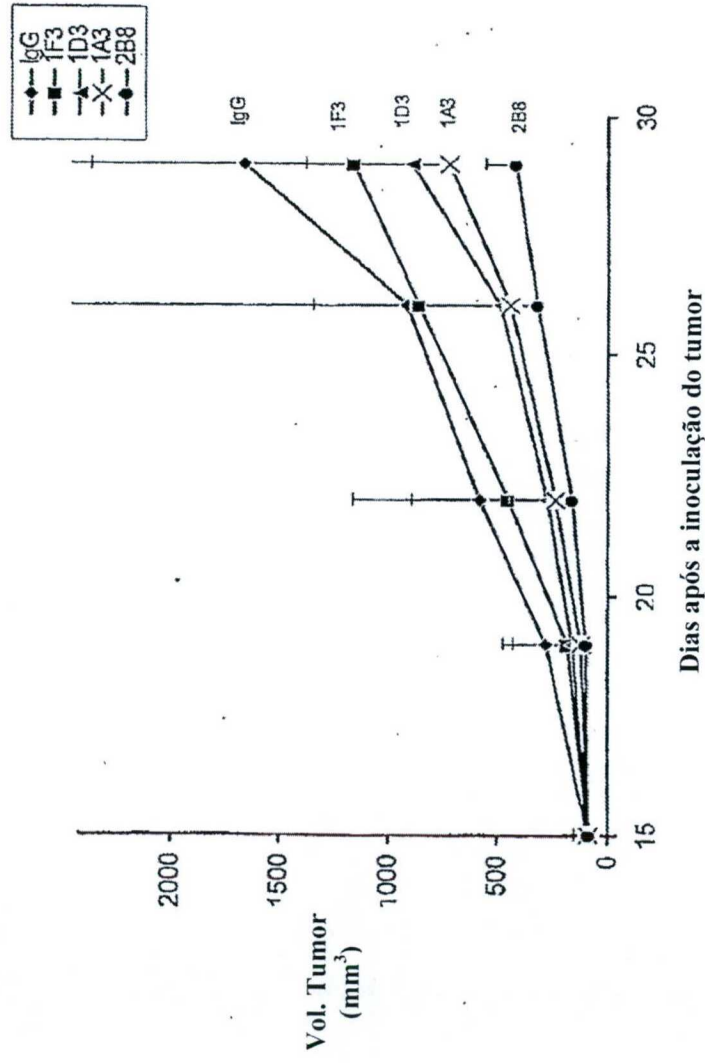


FIG. 7



Kappa	pesada	ka (1/Ms)	STDEV	kd (1/s)	STDEV	KD (pM)	STDEV
2B8 quimérico	2B8 quimérico	2.3x10 <sup>6</sup>		2.7x10 <sup>-5</sup>		11.6	
Hu2B8_Kv1-39.1	2B8 quimérico	2.8x10 <sup>6</sup>		3.9x10 <sup>-5</sup>		13.6	
Hu2B8_Kv3-15.1	2B8 quimérico	3.1x10 <sup>6</sup>		1.7x10 <sup>-5</sup>		5.5	
2B8 quimérico	Hu2B8_Hv1-f.1	2.4x10 <sup>6</sup>		1.6x10 <sup>-3</sup>		662.5	
2B8 quimérico	Hu2B8_Hv5-a.1	2.4x10 <sup>6</sup>		1.1x10 <sup>-5</sup>		4.4	
2B8 quimérico	Hu2B8_Hv5-51.1	2.1x10 <sup>6</sup>		3.4x10 <sup>-5</sup>		16.3	
Hu2B8_Kv1-39.1	Hu2B8_Hv1-f.1	7.1x10 <sup>6</sup>		2.1x10 <sup>-3</sup>		294.0	
Hu2B8_Kv1-39.1	Hu2B8_Hv5-a.1	2.6x10 <sup>6</sup>		3.8x10 <sup>-5</sup>		14.7	
Hu2B8_Kv1-39.1	Hu2B8_Hv5-51.1	2.0x10 <sup>6</sup>	4.2x10 <sup>5</sup>	1.7x10 <sup>-5</sup>	1.4x10 <sup>-5</sup>	8.1	5.3
Hu2B8_Kv3-15.1	Hu2B8_Hv1-f.1	7.8x10 <sup>6</sup>		3.7x10 <sup>-3</sup>		465.8	
Hu2B8_Kv3-15.1	Hu2B8_Hv5-a.1	2.2x10 <sup>6</sup>		5.9x10 <sup>-5</sup>		26.9	
Hu2B8_Kv3-15.1	Hu2B8_Hv5-51.1	1.9x10 <sup>6</sup>	4.7x10 <sup>5</sup>	2.3x10 <sup>-5</sup>	6.3x10 <sup>-6</sup>	12.0	0.4

Fig. 8

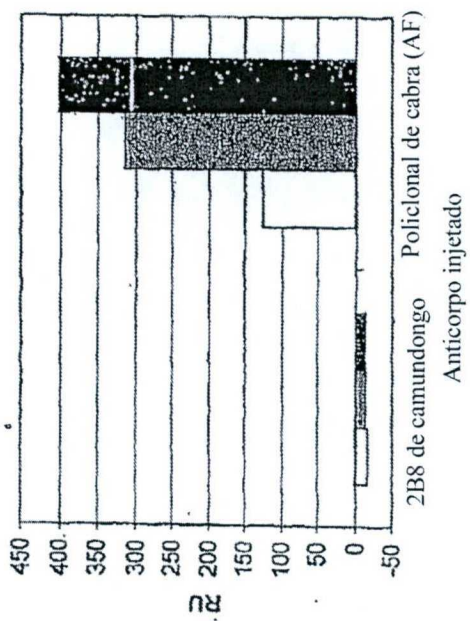


Fig. 9