

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

(22) Data de pedido: 2007.03.27	(73) Titular(es): MEDIMMUNE LIMITED MILSTEIN BUILDING GRANTA PARK CAMBRIDGE, CAMBRIDGESHIRE CB21 6GH GB ZENYTH OPERATIONS PTY. LTD. AU
(30) Prioridade(s): 2006.03.27 US 786569 P	
(43) Data de publicação do pedido: 2012.02.29	
(45) Data e BPI da concessão: 2013.05.08 161/2013	(72) Inventor(es): EMMA COHEN GB RALPH MINTER GB PAULA HARRISON GB MATTHEW SLEEMAN GB ANDREW NASH AU
	(74) Mandatário: NUNO MIGUEL OLIVEIRA LOURENÇO RUA CASTILHO, Nº 50 - 9º 1269-163 LISBOA PT

(54) Epígrafe: **MEMBRO DE LIGAÇÃO PARA O RECETOR DE GM-CSF**

(57) Resumo:
MEMBROS DE LIGAÇÃO PARA A CADEIA ALFA DO RECETOR PARA O FATOR DE ESTIMULAÇÃO DE COLÓNIAS DE GRANULÓCITOS MACRÓFAGOS (GM-CSFR), ESPECIALMENTE MOLÉCULAS DE ANTICORPO. UTILIZAÇÃO DOS MEMBROS DE LIGAÇÃO NO TRATAMENTO DE DOENÇAS INFLAMATÓRIAS E AUTOIMUNES, POR EXEMPLO ARTRITE REUMATOIDE, ASMA, RESPOSTA ALÉRGICA, ESCLEROSE MÚLTIPLA, LEUCEMIA MIELOIDE E ATEROSCLEROSE.

RESUMO

"MEMBRO DE LIGAÇÃO PARA O RECETOR DE GM-CSF"

Membros de ligação para a cadeia alfa do recetor para o fator de estimulação de colónias de granulócitos macrófagos (GM-CSFR), especialmente moléculas de anticorpo. Utilização dos membros de ligação no tratamento de doenças inflamatórias e autoimunes, por exemplo artrite reumatoide, asma, resposta alérgica, esclerose múltipla, leucemia mieloide e aterosclerose.

DESCRIÇÃO

"MEMBRO DE LIGAÇÃO PARA O RECETOR DE GM-CSF"

A presente invenção refere-se a membros de ligação para a cadeia alfa do Recetor do Fator de Estimulação de Colónias de Granulócitos/Macrófagos (GM-CSFR α), especialmente moléculas de anticorpo anti-GMCSFR α . Refere-se também à utilização destes membros de ligação no tratamento de doenças inflamatórias, respiratórias e autoimunes mediadas pelo GMCSFR α , incluindo artrite reumatoide, doença pulmonar obstrutiva crónica e esclerose múltipla.

O GM-CSF é uma citocina pró-inflamatória de tipo I que melhora a sobrevivência, proliferação e/ou diferenciação de uma grande gama de tipos de células hematopoiéticas incluindo neutrófilos, eosinófilos, macrófagos e suas células progenitoras. O recetor de GM-CSF é um membro da superfamília de recetores de hematopietina. É heterodimérico, consistindo de uma subunidade alfa e uma beta. A subunidade alfa é altamente específica para o GM-CSF, enquanto que a subunidade beta é partilhada com outros recetores de citocinas, incluindo IL3 e IL5. Isto reflete-se numa distribuição mais ampla no tecido da subunidade recetora beta. A subunidade alfa, GM-CSFR α , é principalmente expressada em células mieloides e células não hematopoiéticas, tais como neutrófilos, macrófagos, eosinófilos, células dendríticas, células endoteliais e células epiteliais respiratórias. O GM-CSFR α inteiro é uma glicoproteína de membrana de tipo I com 400 aminoácidos que faz parte da família de recetores de citocina de tipo I, e consiste de um péptido sinal de 22 aminoácidos (posições 1-22), um domínio extracelular de 298 aminoácidos (posições 23-320), um domínio transmembranar das posições 321 - 345 e

um domínio intracelular curto de 55 aminoácidos. O péptido sinal é dissociado para proporcionar a forma madura de GM-CSFR α como uma proteína de 378 aminoácidos. Encontram-se disponíveis clones de ADNc do GM-CSFR α humano e murídeo e, ao nível da proteína, as subunidades do recetor têm 36% de identidade. O GM-CSF é capaz de ligar-se com afinidade relativamente baixa à subunidade α sozinha (Kd 1-5 nM) mas de modo nenhum à subunidade β sozinha. No entanto, a presença de ambas as subunidades α e β resulta num complexo ligando-recetor de afinidade elevada (Kd \approx 100pM). A sinalização de GM-CSF ocorre através da sua ligação inicial à cadeia α do GM-CSFR e, em seguida, reticulação com uma subunidade maior a cadeia β comum para gerar a interação de afinidade elevada, que fosforila a via JAK-STAT. A ligação do GM-CSFR ao GMCSF é revista na ref. [1]. Esta interação também é capaz de sinalizar através da fosforilação da tirosina e ativação da via de MAP-cinase.

Patologicamente, foi demonstrado que o GM-CSF desempenha um papel na exacerbação de doenças inflamatórias, respiratórias e autoimunes. A neutralização da ligação de GM-CSF ao GM-CSFR α é, por conseguinte, uma abordagem terapêutica para o tratamento de doenças e condições mediadas pelo GM-CSFR.

Nicola et al. [2] descreveram um anticorpo murídeo contra o GM-CSFR α humano, designado 2B7-17-A ou "2B7", o qual foi descrito como tendo uma afinidade relativamente elevada para o GM-CSFR α humano e como sendo um inibidor potente da ação biológica do GM-CSF humano em vários bioensaios diferentes. O anticorpo 2B7 encontra-se comercialmente disponível de Chemicon como MAB1037, e a Folha de Dados de Produto para o MAB1037 indica que é um inibidor potente da ação biológica do GM-CSF. O 2B7 foi também divulgado na WO94/09149.

Utilizando uma combinação de seleções de bibliotecas de fagos de scFv naturais, mutagênese aleatória e ensaios bioquímicos e biológicos apropriadamente concebidos (ver a Parte Experimental abaixo), nós identificámos moléculas de anticorpo altamente potentes que se ligam ao GM-CSFR α humano e inibem a ação do GM-CSF humano no seu recetor. Os resultados aqui apresentados indicam que os nossos anticorpos ligam uma região ou epítipo diferente do GM-CSFR α em comparação com o anticorpo anti-GM-CSFR α conhecido 2B7, e surpreendentemente são ainda mais potentes do que o 2B7 como demonstrado numa variedade de ensaios biológicos.

Um aspeto da invenção é uma composição compreendendo uma molécula de anticorpo isolada e um excipiente farmacologicamente aceitável, em que a molécula de anticorpo compreende um domínio VH de anticorpo e um domínio VL de anticorpo, compreendendo o domínio VH de anticorpo regiões determinantes de complementaridade (CDRs) de cadeia pesada HCDR1, HCDR2 e HCDR3 e compreendendo o domínio VL as CDRs de cadeia leve LCDR1, LCDR2 e LCDR3, em que as sequências de aminoácidos das CDRs são:

HCDR1 SEQ ID NO: 53

HCDR2 SEQ ID NO: 54

HCDR3 SEQ ID NO: 55

LCDR1 SEQ ID NO: 58

LCDR2 SEQ ID NO: 59, e

LCDR3 SEQ ID NO: 60.

Os anticorpos da invenção são particularmente valiosos na ligação e neutralização de GM-CSFR α e, deste modo, são úteis em tratamentos para doenças mediadas pelo GM-CSFR α , incluindo doenças inflamatórias e autoimunes, como indicado pelas experiências aqui contidas e literatura técnica comprovante. Por exemplo, nós demonstrámos em ensaios baseados em células que os anticorpos da invenção são capazes de inibir a libertação de citocinas (por exemplo

IL-6 e TNF α) induzida pela ligação de GM-CSF nativo ao seu recetor. Como explicado em mais pormenor abaixo, a inibição da atividade do GM-CSF através do bloqueio da ligação ao GM-CSFR α é uma abordagem terapêutica para o tratamento de doenças tais como artrite reumatoide (RA), asma, inflamação das vias aéreas induzida por fumo, doença pulmonar obstrutiva crónica (COPD), resposta alérgica, esclerose múltipla (MS), leucemia mieloide e aterosclerose.

Os membros de ligação de acordo com a invenção geralmente ligam o domínio extracelular de GM-CSFR α . Preferencialmente, um membro de ligação da invenção liga pelo menos um resíduo de Tyr-Leu-Asp-Phe-Gln (YLDFQ), SEQ ID NO: 201, nas posições 226 a 230 do GM-CSFR α humano maduro (SEQ ID NO: 206). O membro de ligação pode ligar pelo menos um resíduo na sequência YLDFQ do GM-CSFR α humano, por exemplo ele pode ligar um, dois, três ou quatro resíduos da sequência YLDFQ. Assim, o membro de ligação pode reconhecer um ou mais resíduos dentro desta sequência, e opcionalmente pode também ligar resíduos flanqueadores adicionais ou resíduos estruturalmente próximos no domínio extracelular de GM-CSFR α .

A ligação pode ser determinada por qualquer método adequado, por exemplo, pode ser utilizado um varrimento de ligação de péptidos, tal como um imunoensaio ligado a enzima (ELISA) baseado em PEPSCAN, como descrito em pormenor aqui noutro sítio. Numa varrimento de ligação de péptidos, tal como o tipo proporcionado pelos Sistemas PEPSCAN, péptidos sobrepostos curtos derivados do antigénio são sistematicamente rastreados no que se refere à ligação a um membro de ligação. Os péptidos podem ser covalentemente acoplados a uma superfície de suporte para formar uma matriz de péptidos. Resumidamente, um varrimento de ligação de péptidos (por exemplo "PEPSCAN") envolve a

identificação (por exemplo, utilizando ELISA) de um conjunto de péptidos ao qual o membro de ligação se liga, em que os péptidos têm sequências de aminoácidos que correspondem a fragmentos de SEQ ID NO: 206 (por exemplo, péptidos de cerca de 15 resíduos contíguos de SEQ ID NO: 206), e o alinhamento dos péptidos para determinar uma impressão de resíduos ligada pelo membro de ligação, em que a impressão compreende resíduos comuns aos péptidos sobrepostos. De acordo com a invenção, a impressão identificada pelo varrimento de ligação de péptidos ou PEPSCAN pode compreender pelo menos um resíduo de YLDFQ que corresponde às posições 226 a 230 de SEQ ID NO: 206. A impressão pode compreender um, dois, três, quatro ou todos os resíduos de YLDFQ. Um membro de ligação de acordo com a invenção pode ligar um fragmento de péptido (por exemplo de 15 resíduos) de SEQ ID NO: 206 compreendendo um ou mais, preferencialmente todos os resíduos YLDFQ correspondentes às posições 226 a 230 de SEQ ID NO: 206, por exemplo como determinado por um varrimento de ligação de péptidos ou método PEPSCAN aqui descrito. Assim, um membro de ligação da invenção pode ligar um péptido possuindo uma sequência de aminoácidos de 15 resíduos contíguos de SEQ ID NO: 206, em que a sequência de 15 resíduos compreende pelo menos um resíduo de, ou, pelo menos, sobrepõe-se parcialmente com, YLDFQ nas posições 226 a 230 de SEQ ID NO: 206. Os detalhes de um método de varrimento de ligação de péptidos adequado para determinar a ligação são explicitados em pormenor aqui noutro sítio. Outros métodos que são bem conhecidos na técnica e poderiam ser utilizados para determinar os resíduo ligados por um anticorpo, e/ou para confirmar os resultados do varrimento de ligação de péptidos (por exemplo PEPSCAN), incluem a mutagénesse específica de um locus, troca hidrogénio deutério, espetrometria de massa, RMN e cristalografia de raios X.

Por conseguinte, um membro de ligação da invenção neutraliza preferencialmente o GM-CSFR α . Neutralização significa redução ou inibição da atividade biológica de GM-CSFR α , por exemplo redução ou inibição da ligação do GM-CSF ao GM-CSFR α , ou da sinalização pelo GM-CSFR α , por exemplo como medido pelas respostas mediadas pelo GM-CSFR α . A redução ou inibição da atividade biológica pode ser parcial ou total. O grau em que um anticorpo neutraliza o GM-CSFR α é referido como a sua potência de neutralização. A potência pode ser determinada ou medida utilizando um ou mais ensaios conhecidos do especialista e/ou como descrito ou referido aqui. Por exemplo, o membro de ligação pode ter atividade de neutralização em um ou mais dos seguintes ensaios:

- Ensaio bioquímico de ligação a ligando
- Ensaio de proliferação de TF-1
- Ensaio de alteração da forma de granulócitos humanos
- Ensaio de alteração da forma de granulócitos de primatas não humanos em *Cynomolgus*
- Ensaio de libertação de TNF α de monócitos
- Ensaio de sobrevivência de granulócitos
- Ensaio de formação de colónias (inibição da diferenciação mediada por GM-CSF *in vitro* de progenitores de células sanguíneas)
- Inibição da bioatividade de GM-CSF *in vivo* por exemplo em ratos quiméricos com medula óssea transgénica que expressa o GM-CSFR humano
- Ensaio de libertação de citocinas de células mononucleares do sangue periférico

A potência é normalmente expressada como um valor de IC₅₀, em pM salvo indicação em contrário. Nos ensaios funcionais, a IC₅₀ é a concentração que reduz uma resposta biológica em

50 % do seu máximo. Nos estudos de ligação a ligando, a IC50 é a concentração que reduz a ligação ao recetor em 50 % do nível máximo de ligação específica. A IC50 pode ser calculada representando graficamente a % de resposta biológica máxima (representada, por exemplo, pela proliferação celular, a qual pode ser medida como a incorporação de 3H timidina em cpm, num ensaio de proliferação, pela alteração de forma num ensaio de alteração de forma, pela libertação de TNF α num ensaio de libertação de TNF α , pela sobrevivência num ensaio de sobrevivência, pelo número de colónias num ensaio de formação de colónias, ou pelo aumento do peso do baço ou pela diminuição dos monócitos circulantes em ratos quiméricos com medula óssea transgénica que expressa o GM-CSFR humano num teste de bioatividade) ou % de ligação específica ao recetor como uma função do log da concentração do membro de ligação, e utilizando um programa de software tal como o Prism (GraphPad) para ajustar uma função sigmoide aos dados para gerar valores de IC50.

Um valor de IC50 pode representar a média de uma multiplicidade de medições. Assim, por exemplo, os valores de IC50 podem ser obtidos a partir dos resultados de experiências em triplicado, e pode ser depois calculado um valor de IC50 médio.

No ensaio de proliferação de TF-1, os membros de ligação da invenção têm normalmente uma IC50 inferior a 1500 pM. Por exemplo, a IC50 pode ser < 300, < 60, < 10 ou < 1,5 pM, por exemplo, cerca de 1,0 pM. Normalmente, a IC50 é pelo menos 0,5 ou 1,0 nM. O anticorpo murídeo conhecido 2B7 tinha uma IC50 de cerca de 1600 pM neste ensaio. O ensaio de proliferação de TF-1 aqui utilizado foi com uma concentração final de 7 pM de GM-CSF humano. Assim, a potência de neutralização IC50 no ensaio de proliferação de

TF-1 representa a aptidão de um membro de ligação para inibir a proliferação de células TF-1 induzida por 7 pM de GM-CSF humano. Para mais detalhes ver a secção de Métodos de Ensaio e Materiais.

Um membro de ligação da invenção pode ter uma pA_2 mais negativa do que -6, -7, -8, -9, -10, -10,5 ou -11 no ensaio de proliferação de TF-1. Por exemplo, a pA_2 pode ser de cerca de -10,5 ou -11. O cálculo e o significado dos valores de pA_2 são discutidos em pormenor na Parte Experimental sob Métodos de Ensaio e Materiais.

No ensaio de alteração da forma de granulócitos humanos, os membros de ligação da invenção têm normalmente uma IC50 inferior a 100 pM, por exemplo inferior a 50 pM ou inferior a 30, 25, 20, 15 ou 10 pM. Normalmente, a IC50 é pelo menos 5, 6 ou 7 pM. Em contraste, o anticorpo murídeo conhecido 2B7 é menos potente com uma IC50 medida de 477 pM neste ensaio. O ensaio de alteração da forma de granulócitos humanos aqui utilizado foi com uma concentração final de 7 pM de GM-CSF humano. Assim, a potência de neutralização IC50 no ensaio de alteração da forma de granulócitos humanos representa a aptidão de um membro de ligação para inibir a alteração de forma de granulócitos humanos induzida por 7 pM de GM-CSF humano. Para mais detalhes ver a secção de Métodos de Ensaio e Materiais.

No ensaio de alteração da forma de granulócitos de cynomolgus, os membros de ligação da invenção têm normalmente uma IC50 de menos de 20 pM, tipicamente inferior a 10, 5 ou 2,5 pM. A IC50 pode ser de pelo menos 0,5, 1 ou 1,5 pM. O anticorpo murídeo conhecido 2B7 tinha uma IC50 de 26 pM quando testado neste ensaio. O ensaio de alteração da forma de granulócitos de cynomolgus aqui utilizado foi com uma concentração final de 7 pM de GM-CSF

humano. Assim, a potência de neutralização IC₅₀ no ensaio de alteração da forma de granulócitos de cynomolgus representa a aptidão de um membro de ligação para inibir a alteração de forma de granulócitos de cynomolgus induzida por 7 pM de GM-CSF humano. Para mais detalhes ver a secção de Métodos de Ensaio e Materiais.

Um membro de ligação da invenção pode ter uma pA₂ mais negativa do que -6, -7, -8, -9, -10, -10,5 ou -11 no ensaio de alteração de forma humano e/ou cynomologus. Preferencialmente a pA₂ é de cerca de -10 ou -11.

No ensaio de libertação de TNF α de monócitos, os membros de ligação da invenção têm normalmente uma IC₅₀ inferior a 150 pM, tipicamente inferior a 110 pM, por exemplo, inferior a 100pM. A IC₅₀ pode ser pelo menos 30 ou 40 pM. O ensaio de libertação de TNF α de monócitos aqui utilizado foi com uma concentração final de 1 nM de GM-CSF humano. Assim, a potência de neutralização IC₅₀ no ensaio de libertação de TNF α de monócitos representa a aptidão de um membro de ligação para inibir a libertação de TNF α a partir de monócitos humanos estimulados com 1 nM de GM-CSF humano. Para mais detalhes ver a secção de Métodos de Ensaio e Materiais.

No ensaio de sobrevivência de granulócitos, os membros de ligação da invenção têm normalmente uma IC₅₀ inferior a 1000 pM, tipicamente inferior a 850 pM. A IC₅₀ pode ser inferior a 500, 250, 150, 100, 50, 30, 20 ou 10 pM. A IC₅₀ pode ser de pelo menos 5 pM. O anticorpo murídeo conhecido 2B7 é inativo neste ensaio até uma concentração de 83nM. O ensaio de sobrevivência de granulócitos aqui utilizado foi com uma concentração final de 7 pM de GM-CSF humano. Assim, a potência de neutralização IC₅₀ no ensaio de sobrevivência de granulócitos representa a aptidão de um membro de

ligação para inibir a sobrevivência de granulócitos humanos induzida por 7 pM de GM-CSF humano. Para mais detalhes ver a secção de Métodos de Ensaio e Materiais.

No ensaio de formação de colónias, os membros de ligação da invenção podem ter uma IC50 inferior a 5, inferior a 2,5, inferior a 1 ou inferior a 0,3 µg/mL. Preferencialmente, a IC50 é 0,25 µg/mL ou menos, por exemplo inferior a 0,1 µg/mL. A IC50 pode ser de pelo menos 0,05 µg/mL. O anticorpo murídeo conhecido 2B7 tem pouca, se é que alguma, atividade neste ensaio até uma concentração de 10µg/mL (67nM). O ensaio de formação de colónias aqui utilizado foi com uma concentração final de 10 ng/mL de GM-CSF humano. Assim, a potência de neutralização IC50 no ensaio de formação de colónias representa a aptidão de um membro de ligação para inibir a formação de colónias induzida por 10 ng/mL de GM-CSF humano. Para mais detalhes ver a secção de Métodos de Ensaio e Materiais.

Um membro de ligação da invenção pode apresentar uma aptidão dependente da dose para inibir o aumento de peso do baço e/ou para inibir uma diminuição dos monócitos circulantes induzida por GM-CSF em ratos quiméricos com medula óssea transgénica que expressa o GM-CSFR humano, que são tratados com GM-CSF humano. A IC50 para a inibição do aumento de peso do baço pode ser inferior a 5, inferior a 2,5, inferior a 2, inferior a 1 ou inferior a 0,75 mg/kg. Nalgumas formas de realização, a IC50 pode ser de pelo menos 0,5 mg/kg.

Adicionalmente, a cinética e afinidade de ligação de membros de ligação para o GM-CSFR α humano podem ser determinadas, por exemplo por ressonância plasmónica superficial, por exemplo, utilizando BIAcore. Os membros de ligação da invenção têm normalmente uma KD inferior a 5 nM

e mais preferencialmente inferior a 4, 3, 2 ou 1 nM. Preferencialmente, a KD é inferior a 0,9, 0,8, 0,7, 0,6, 0,5, 0,4, 0,3, 0,2 ou 0,15 nM.

Os membros de ligação da invenção normalmente ligam o GM-CSFR α de primatas não humanos, por exemplo GM-CSFR α de cynomolgous além de GM-CSFR α humano. Como existe uma homologia baixa entre o recetor de GM-CSF humano e murídeo (aproximadamente 36%), os membros de ligação da invenção geralmente não se ligarão ou reagirão de forma cruzada com o recetor murídeo.

Um membro de ligação da invenção compreende uma molécula de anticorpo, por exemplo um anticorpo inteiro ou fragmento de anticorpo, como discutido em mais pormenor abaixo. Preferencialmente, uma molécula de anticorpo da invenção é uma molécula de anticorpo humano.

Um membro de ligação da invenção compreende um domínio VH e/ou VL de anticorpo. Dentro de cada um dos domínios VH e VL encontram-se regiões determinantes de complementaridade ("CDRs") e regiões estruturais ("FRs"). Um domínio VH compreende um conjunto de HCDRs e um domínio VL compreende um conjunto de LCDRs. Uma molécula de anticorpo compreende tipicamente um domínio VH de anticorpo compreendendo uma CDR1, CDR2 e CDR3 e uma estrutura de VH. Aquela pode, alternativa ou adicionalmente, compreender um domínio VL de anticorpo compreendendo uma CDR1, CDR2 e CDR3 e uma estrutura de VL. Uma estrutura do domínio VH ou VL compreende quatro regiões estruturais, FR1, FR2, FR3 e FR4, interpoladas com CDRs na estrutura seguinte:

FR1 - CDR1 FR2 - CDR2 - FR3 - CDR3 - FR4.

Os exemplos de domínios VH e VL de anticorpo, FRs e CDRs são como listados na listagem de sequências apenas que fazem parte da presente divulgação. Um "conjunto de CDRs" compreende CDR1, CDR2 e CDR3. Assim, um conjunto de HCDRs significa HCDR1, HCDR2 e HCDR3, e um conjunto de LCDRs significa LCDR1, LCDR2 e LCDR3. Salvo indicação em contrário, um "conjunto de CDRs" inclui HCDRs e LCDRs. Tipicamente, os membros de ligação da invenção são anticorpos monoclonais (mAb).

Como descrito em mais pormenor na Parte Experimental, nós identificámos um painel de moléculas de anticorpo que ligam o GM-CSFR α . Nós também identificámos certos resíduos dentro das regiões determinantes de complementaridade (CDRs) dos domínios VH e VL que são especialmente importantes para a ligação ao recetor e para a potência de neutralização. Uma vez que as CDRs são os responsáveis primários pela determinação da ligação e especificidade de um membro de ligação, uma ou mais CDRs possuindo os resíduos apropriados como aqui definidos podem ser utilizadas e incorporadas em qualquer estrutura adequada, por exemplo uma estrutura do domínio VH e/ou VL de anticorpo, ou uma armação proteica não anticorpo, como descrita em mais pormenor aqui noutra sítio. Por exemplo, uma ou mais CDRs ou um conjunto de CDRs de um anticorpo podem ser enxertadas numa estrutura (por exemplo estrutura humana) para proporcionar uma molécula de anticorpo ou diferentes moléculas de anticorpo. Por exemplo, uma molécula de anticorpo pode compreender CDRs como aqui divulgadas e regiões estruturais de sequências de segmentos do gene da linha germinal humana. Pode ser proporcionado um anticorpo com um conjunto de CDRs dentro de uma estrutura que pode ser sujeita a manipulação germinal, onde um ou mais resíduos dentro da estrutura são alterados para condizer com os resíduos na posição equivalente na estrutura da linha germinal humana mais

semelhante. Assim, as regiões estruturais do anticorpo são preferencialmente de linhas germinais e/ou humanas.

Nós realizámos uma investigação para determinar quais os resíduos de um anticorpo candidato eram importantes para reconhecimento do antigénio, seguindo o método explicitado na secção experimental, e em seguida realizámos a análise da sequência de 160 clones que exibiram uma potência pelo menos 5 vezes superior à do clone de anticorpo parental num ensaio biológico. Os resultados indicaram as seguintes posições como contribuindo para a ligação ao antigénio: resíduos Kabat 27A, 27B, 27C, 32, 51, 52, 53, 90, 92 e 96 no domínio VL e resíduos Kabat 17, 34, 54, 57, 95, 97, 99 e 100B no domínio VH.

A nossa análise indicou 4 posições de resíduos nas CDRs que têm uma influência particularmente forte na ligação do recetor: H97, H100B, L90 e L92 (numeração Kabat). O resíduo de serina na posição posição H97 de VHCDR3 foi observado em todos os 160 clones e, por conseguinte, representam um resíduo importante para reconhecimento do antigénio.

O resíduo Kabat H17 na estrutura do domínio VH é preferencialmente S. O resíduo Kabat H94 é preferencialmente I ou uma substituição conservadora do mesmo (por exemplo L, V, A ou M). Normalmente, o H94 é I.

A molécula de anticorpo é preferencialmente uma molécula de anticorpo humano possuindo um domínio VH compreendendo um conjunto de HCDRs numa estrutura de linha germinal humana, por exemplo estrutura de linha germinal humana da família da cadeia pesada VH1 ou VH3. Numa forma de realização preferida, a molécula de anticorpo humano isolada tem um domínio VH compreendendo um conjunto de HCDRs numa estrutura de linha germinal humana VH1 DP5 ou VH3 DP47.

Assim, as regiões estruturais do domínio VH podem compreender regiões estruturais do segmento VH1 DP5 ou VH3 DP47 do gene da linha germinal humana. A sequência de aminoácidos da FR1 de VH pode ser a SEQ ID NO: 251. A sequência de aminoácidos da FR2 de VH pode ser a SEQ ID NO: 252. A sequência de aminoácidos da FR3 de VH pode ser a SEQ ID NO: 253. A sequência de aminoácidos da FR4 de VH pode ser a SEQ ID NO: 254.

A molécula de anticorpo também tem um domínio VL compreendendo um conjunto de LCDRs, preferencialmente numa estrutura de linha germinal humana por exemplo uma estrutura de linha germinal humana da cadeia leve da família VLambda 1 ou VLambda 6. Numa forma de realização preferida, a molécula de anticorpo humano isolada tem um domínio VL compreendendo um conjunto de LCDRs numa estrutura de linha germinal humana VLambda 1 DPL8 ou VLambda 1 DPL3 ou VLambda 6_6a. Assim, a estrutura do domínio VL pode compreender regiões estruturais do segmento VLambda 1 DPL8, VLambda 1 DPL3 ou VLambda 6_6a do gene da linha germinal humana. A FR4 do domínio VL pode compreender uma região estrutural do segmento JL2 do gene da linha germinal humana. A sequência de aminoácidos da FR1 de VL pode ser a SEQ ID NO: 255. A sequência de aminoácidos da FR2 de VL pode ser a SEQ ID NO: 256. A sequência de aminoácidos da FR3 de VL pode ser a 257. A sequência de aminoácidos da FR4 de VL pode ser a SEQ ID NO: 258.

Um anticorpo de não-linha germinal tem as mesmas CDRs, mas estruturas diferentes, em comparação com um anticorpo de linha germinal.

Um membro de ligação da invenção pode competir pela ligação ao GM-CSFR α com qualquer membro de ligação aqui divulgado, por exemplo o anticorpo 3 ou quaisquer dos anticorpos 1, 2

ou 4-20. Assim, um membro de ligação pode competir pela ligação ao GM-CSFR α com uma molécula de anticorpo compreendendo o domínio VH e o domínio VL de qualquer um dos anticorpos 1, 2 ou 4-20. A competição entre membros de ligação pode ser facilmente analisada *in vitro*, por exemplo adicionando uma molécula repórter a um membro de ligação que pode ser detetado na presença de um ou mais de outros membros de ligação não marcados, para possibilitar a identificação de membros de ligação que ligam o mesmo epítopo ou um epítopo sobreposto.

Por exemplo, a competição pode ser determinada utilizando um ELISA, no qual, por exemplo, o domínio extracelular de GM-CSFR α , ou um péptido do domínio extracelular, é imobilizado numa placa e é adicionado à placa um primeiro membro de ligação marcado juntamente com um ou mais de outros membros de ligação não marcados. A presença de um membro de ligação não marcado que compete com o membro de ligação marcado é observada por uma diminuição no sinal emitido pelo membro de ligação marcado. Analogamente, pode ser utilizado um ensaio de ressonância plasmónica superficial para determinar a competição entre membros de ligação.

Ao testar quanto à competição pode ser utilizado um fragmento de péptido do antigénio, especialmente um péptido incluindo ou consistindo essencialmente de um epítopo ou região de ligação de interesse. Pode ser utilizado um péptido possuindo o epítopo ou a sequência alvo juntamente com um ou mais aminoácidos em quaisquer das extremidades. Os membros de ligação de acordo com a presente invenção podem ser de tal forma que a sua ligação ao antigénio é inibida por um péptido com ou incluindo a sequência dada.

Os membros de ligação que ligam um péptido podem ser isolados, por exemplo, a partir de uma biblioteca de apresentação de fagos por combinação com o(s) péptido(s).

Um membro de ligação como acima pode ser utilizado para medir níveis de antigénio num ensaio de competição, ou seja um método de medição do nível de antigénio numa amostra utilizando um membro de ligação como proporcionado pela presente invenção num ensaio de competição. Isto pode ser o caso quando não é necessária separação física do antigénio ligado do não ligado. A ligação de uma molécula repórter ao membro de ligação de modo que ocorra uma alteração física ou ótica aquando da ligação é uma possibilidade. A molécula repórter pode gerar direta ou indiretamente sinais detetáveis, e preferencialmente mensuráveis. A ligação de moléculas repórter pode ser direta ou indiretamente, de forma covalente, por exemplo via uma ligação peptídica, ou não covalente. A ligação via uma ligação peptídica pode ser o resultado da expressão recombinante de uma fusão de gene que codifica o anticorpo e a molécula repórter.

Os níveis de antigénio também podem ser medidos diretamente, utilizando um membro de ligação de acordo com a invenção, por exemplo, num sistema biossensor.

A ligação de um membro de ligação como aqui proporcionado ao GM-CSFR α pode ocorrer *in vivo*, por exemplo após administração de um membro de ligação, ou ácido nucleico que codifica um membro de ligação, ou pode ocorrer *in vitro*, por exemplo em ELISA, transferência de Western, imunocitoquímica, imunoprecipitação, cromatografia de afinidade, ou ensaios baseados em células tal como um ensaio de TF-1.

Pode determinar-se a quantidade de ligação do membro de ligação ao GM-CSFR α . A quantificação pode ser relacionada com a quantidade de antigénio numa amostra de ensaio, a qual pode ser de interesse diagnóstico ou prognóstico.

É também descrito um kit compreendendo um membro de ligação ou molécula de anticorpo de acordo com qualquer aspeto ou forma de realização da presente invenção. No kit, o membro de ligação ou molécula de anticorpo pode ser marcado para permitir que se determine a sua reatividade numa amostra, por exemplo como descrito mais abaixo. Os componentes de um kit são geralmente estéreis e estão em frascos selados ou outros recipientes. Os kits podem ser utilizados em análise de diagnóstico ou outros métodos para os quais são úteis as moléculas de anticorpo. Um kit pode conter instruções de utilização dos componentes num método. Num kit da invenção podem ser incluídos materiais auxiliares para ajudar ou permitir a realização de um tal método.

As reatividades dos anticorpos numa amostra podem ser determinadas por qualquer meio apropriado. O radioensaio (RIA) é uma possibilidade. Antigénio marcado radioativo é misturado com antigénio não marcado (a amostra de ensaio) e deixado ligar-se ao anticorpo. O antigénio ligado é fisicamente separado do antigénio não ligado e determinada a quantidade de antigénio radioativo ligado ao anticorpo. Quanto mais antigénio existe na amostra de ensaio, tanto menos antigénio radioativo se ligará ao anticorpo. Pode ser também utilizado um ensaio de ligação competitiva com antigénio não radioativo, utilizando o antigénio ou um análogo ligado a uma molécula repórter. A molécula repórter pode ser um fluorocromo, corante de fósforo ou para laser com características de absorção ou emissão espectralmente isoladas. Os fluorocromos adequados incluem fluoresceína, rodamina, ficoeritrina e

Vermelho do Texas. Os corantes cromogénicos adequados incluem diaminobenzidina. Outros repórteres incluem partículas coloidais macromoleculares ou material em partículas tais como esferas de látex que são coloridas, magnéticas ou paramagnéticas, e agentes biológica ou quimicamente ativos que podem originar, direta ou indiretamente, sinais detetáveis que podem ser observados visualmente, detetados eletronicamente ou registados de outro modo. Estas moléculas podem ser enzimas, as quais, por exemplo, catalisam reações que desenvolvem ou alteram cores, ou originam alterações nas propriedades elétricas. Elas podem ser molecularmente excitáveis, de tal forma que transições eletrónicas entre estados de energia resultam em absorções ou emissões espectrais características. Elas podem incluir entidades químicas utilizadas em conjunto com biossensores. Podem ser utilizados sistemas de deteção de biotina/avidina ou biotina/estreptavidina e fosfatase alcalina.

Os sinais gerados por conjugados anticorpo-repórter individuais podem ser utilizados para obter dados absolutos ou relativos quantificáveis da ligação do anticorpo relevante em amostras (normal e ensaio).

É também descrito um ácido nucleico isolado que compreende uma sequência que codifica um membro de ligação, domínio VH e/ou domínio VL como aqui explicitado. O ácido nucleico pode incluir ADN e/ou ARN, e pode ser total ou parcialmente sintético. A referência a uma sequência de nucleótidos como aqui explicitada abrange uma molécula de ADN com a sequência especificada e abrange uma molécula de ARN com a sequência especificada na qual T é substituída por U, a menos que o contexto exija de outro modo. O ácido nucleico pode codificar um CDR ou conjunto de CDRs ou domínio VH ou domínio VL ou sítio de ligação de antígeno de anticorpo ou

molécula de anticorpo, por exemplo scFv ou IgG1 ou IgG4, da invenção como aqui definida. As construções podem ser proporcionadas na forma de plasmídeos, vetores, cassetes de transcrição ou expressão que compreendem pelo menos um polinucleótido como acima.

Uma célula hospedeira pode ser transformada com, ou pode conter, o ácido nucleico. Uma tal célula hospedeira pode estar *in vitro* e pode estar em cultura.

Esse ácido nucleico pode ser introduzido numa célula hospedeira. A introdução pode utilizar qualquer técnica disponível. Para células eucarióticas, as técnicas adequadas podem incluir transfeção com fosfato de cálcio, DEAE-Dextrano, electroporação, transfeção mediada por lipossomas e transdução utilizando retrovírus ou outros vírus, por exemplo vaccinia ou, para células de inseto, baculovírus. A introdução de ácido nucleico na célula hospedeira, em particular uma célula eucariótica, pode utilizar um sistema viral ou baseado em plasmídeo. O sistema de plasmídeo pode ser mantido episomicamente ou pode ser incorporado na célula hospedeira ou num cromossoma artificial. A incorporação pode ser por integração aleatória ou dirigida de uma ou mais cópias em sítios únicos ou múltiplos. No caso de células bacterianas, as técnicas adequadas podem incluir transformação com cloreto de cálcio, electroporação e transfeção utilizando bacteriófagos.

A introdução pode ser seguida de originar ou permitir a expressão do ácido nucleico, por exemplo cultivando as células hospedeiras sob condições para expressão do gene.

Numa forma de realização, o ácido nucleico da invenção é integrado no genoma (por exemplo cromossoma) da célula

hospedeira. A integração pode ser promovida pela inclusão de sequências que promovem a recombinação com o genoma, de acordo com técnicas correntes.

A presente invenção também proporciona um método que compreende a utilização de uma construção como especificada acima num sistema de expressão para expressar um membro de ligação como acima. Um método pode compreender a expressão do referido ácido nucleico sob condições para provocar a produção do referido membro de ligação e recuperá-lo. Um tal método pode compreender cultivar as células hospedeiras sob condições para produzir o referido membro de ligação.

Um método de produção pode compreender um passo de isolamento e/ou purificação do produto. Um método de produção pode compreender a formulação do produto numa composição incluindo pelo menos um componente adicional, tal como um excipiente farmacologicamente aceitável.

Os sistemas para clonagem e expressão de um polipéptido numa variedade de células hospedeiras diferentes são bem conhecidos. As células hospedeiras adequadas incluem bactérias, células de mamífero, células vegetais, levedura e sistemas de baculovírus e plantas e animais transgênicos. A expressão de anticorpos e fragmentos de anticorpo nas células procarióticas está bem estabelecido na técnica [3]. Um hospedeiro bacteriano comum, preferido é a *E. coli*.

A expressão em células eucarióticas em cultura está também disponível para os especialistas na técnica como uma opção para a produção de um membro de ligação [4,5,6]. As linhas de células de mamíferos disponíveis na técnica para expressão de um polipéptido heterólogo incluem células de ovário de hamster Chinês (CHO), células HeLa, células renais de cria de hamster, células de melanoma de rato NS0,

células de mieloma de ratazana YB2/0, células de rim embrionário humano, células de retina embrionária humana e muitas outras.

Podem ser escolhidos ou construídos vetores adequados, contendo sequências reguladoras apropriadas, incluindo sequências promotoras, sequências de terminação, sequências de poliadenilação, sequências intensificadoras, genes marcadores e outras sequências, consoante apropriado. Os vetores podem ser plasmídeos por exemplo fagomídeo, ou virais por exemplo 'fago, consoante apropriado [7]. Muitas técnicas e protocolos conhecidos para a manipulação de ácido nucleico, por exemplo na preparação de construções de ácido nucleico, mutagénesse, sequenciação, introdução de ADN em células e expressão de genes, e análise de proteínas, são descritos em pormenor em Ausubel et al. [8].

Um ou mais membros de ligação capazes de ligar o antigénio podem ser obtidos por um método que inclui pôr em contacto uma biblioteca de membros de ligação de acordo com a invenção e o referido antigénio, e seleccionar um ou mais membros de ligação da biblioteca capazes de ligar o referido antigénio.

A biblioteca pode ser apresentada sobre partículas ou complexos moleculares, por exemplo pacotes genéticos replicáveis tais como partículas de levedura, bacterianas ou de bacteriófagos (por exemplo T7), ou sistemas de apresentação *in vitro* covalentes, ribossómicos ou outros, contendo cada partícula ou complexo molecular o ácido nucleico que codifica o domínio variável VH de anticorpo apresentado sobre o mesmo e, opcionalmente, também um domínio VL apresentado, se presente. Após seleção dos membros de ligação capazes de ligar o antigénio e apresentação em bacteriófagos ou outras partículas ou

complexos moleculares da biblioteca, o ácido nucleico pode ser retirado de um bacteriófago ou outra partícula ou complexo molecular que apresente o referido membro de ligação selecionado. Esse ácido nucleico pode ser utilizado na produção posterior de um membro de ligação ou um domínio variável VH ou VL de anticorpo por expressão a partir de ácido nucleico com a sequência de ácido nucleico retirada de um bacteriófago ou outra partícula ou complexo molecular que apresenta o referido membro de ligação selecionado.

Um domínio variável VH de anticorpo com a sequência de aminoácidos de um domínio variável VH de anticorpo de um referido membro de ligação selecionado pode ser proporcionado na forma isolada, como pode um membro de ligação compreendendo um tal domínio VH.

Um domínio variável VL de anticorpo com a sequência de aminoácidos de um domínio variável VL de anticorpo de um referido membro de ligação selecionado pode ser proporcionado na forma isolada, como pode um membro de ligação compreendendo um tal domínio VL.

A aptidão para ligar o GM-CSFR α pode ser adicionalmente testada, bem como a aptidão para competir com quaisquer dos anticorpos 1 a 20 (por exemplo no formato de scFv e/ou formato de IgG, por exemplo IgG1 ou IgG4) para se ligar ao GM-CSFR α . Pode ser testada a aptidão para neutralizar o GM-CSFR α .

As variantes dos domínios VH e VL e das CDRs da presente invenção, incluindo aquelas para as quais são aqui explicitadas sequências de aminoácidos, podem ser obtidas por meio de métodos de alteração de sequência ou mutação e seleção, e podem ser utilizadas em membros de ligação para o GM-CSFR α . Seguindo a orientação da química computacional

na aplicação de técnicas de análise multivariada de dados às relações estrutura/propriedade-atividade [9], as relações atividade quantitativa-propriedade dos anticorpos podem ser derivadas utilizando técnicas matemáticas bem conhecidas tais como regressão estatística, reconhecimento e classificação de padrões [10,11,12,13,14,15]. As propriedades dos anticorpos podem ser derivadas a partir de modelos empíricos e teóricos (por exemplo, análise de resíduos de contacto provável ou propriedade físico-química calculada) de sequência de anticorpos, estruturas funcionais e tridimensionais e estas propriedades podem ser consideradas isoladamente e em combinação.

Um sítio de ligação de antigénio de anticorpo constituído por um domínio VH e um domínio VL é constituído por seis ansas de polipéptido: três do domínio variável de cadeia leve (VL) e três do domínio variável de cadeia pesada (VH). A análise de anticorpos de estrutura atómica conhecida esclareceu relações entre a sequência e estrutura tridimensional de sítios de combinação dos anticorpos [16,17]. Estas relações implicam que, exceto para a terceira região (ansa) nos domínios VH, as ansas do sítio de ligação possuam uma de um número pequeno de conformações da cadeia principal: estruturas canónicas. Foi demonstrado que a estrutura canónica que se forma numa ansa particular é determinada pelo seu tamanho e pela presença de certos resíduos em sítios chave tanto na ansa como em regiões estruturais [16,17].

Este estudo da relação sequência-estrutura pode ser utilizado para prever os resíduos num anticorpo de sequência conhecida, mas de uma estrutura tridimensional desconhecida, que são importantes para manter a estrutura tridimensional das suas ansas de CDR e, deste modo, manter a ligação. Estas previsões podem ser corroboradas pela

comparação das previsões com o resultado de experiências de otimização de líder. Numa abordagem estrutural pode ser criado um modelo da molécula de anticorpo [18] utilizando qualquer pacote comercial ou livremente disponível tal como o WAM [19]. Um pacote de software de visualização e análise de proteínas tal como o Insight II (Accelrys, Inc.) ou Deep View [20] pode ser depois utilizado para avaliar as substituições possíveis em cada posição da CDR. Esta informação pode ser depois utilizada para fazer substituições com probabilidade de ter um efeito mínimo ou benéfico na atividade.

As técnicas necessárias para fazer substituições nas sequências de aminoácidos de CDRs, domínios VH ou VL de anticorpo e membros de ligação estão geralmente disponíveis na técnica. Podem ser preparadas sequências variantes, com substituições que podem ou não ser previstas como tendo um efeito mínimo ou benéfico na atividade, e testadas quanto à aptidão para ligarem e/ou neutralizarem o GM-CSFR α e/ou quanto a qualquer outra propriedade desejada.

Como discutido, de acordo com a presente invenção podem ser utilizadas variantes da sequência de aminoácidos do domínio variável de qualquer um dos domínios VH e VL, cujas sequências são aqui especificamente divulgadas. As variantes particulares podem incluir uma ou mais alterações da sequência de aminoácidos (adição, supressão, substituição e/ou inserção de um resíduo de aminoácido), podem ser menos de cerca de 20 alterações, menos de cerca de 15 alterações, menos de cerca de 10 alterações ou menos de cerca de 5 alterações, podem ser 5, 4, 3, 2 ou 1. Podem ser feitas alterações em uma ou mais regiões estruturais e/ou uma ou mais CDRs.

Preferencialmente, as alterações não resultam na perda de função, pelo que um membro de ligação compreendendo uma sequência de aminoácidos assim alterada retém preferencialmente uma aptidão para ligar e/ou neutralizar o GM-CSFR α . Mais preferencialmente, ele retém a mesma ligação quantitativa e/ou aptidão de neutralização que um membro de ligação em que não é feita a alteração, por exemplo como medida num ensaio aqui descrito. Muito preferencialmente, o membro de ligação compreendendo uma sequência de aminoácidos assim alterada tem uma melhor aptidão para ligar ou neutralizar o GM-CSFR α em comparação com um membro de ligação em que não é feita a alteração, por exemplo como medida num ensaio aqui descrito.

A alteração pode compreender substituir um ou mais resíduos de aminoácido por um aminoácido não natural ou não corrente, modificar um ou mais resíduos de aminoácido em uma forma não natural ou não corrente, ou inserir um ou mais aminoácidos não naturais ou não correntes na sequência. Os números e as localizações preferidas das alterações nas sequências da invenção são aqui descritas noutro sítio. Os aminoácidos naturais incluem os 20 L-aminoácidos "correntes" identificados como G, A, V, L, I, M, P, F, W, S, T, N, Q, Y, C, K, R, H, D, E pelos seus códigos padrão de uma letra. Os aminoácidos não correntes incluem qualquer outro resíduo que possa ser incorporado numa estrutura de polipéptido ou resulte da modificação de um resíduo de aminoácido existente. Os aminoácidos não correntes pode ser naturais ou não naturais. Vários aminoácidos não correntes naturais são conhecidos na técnica, tais como 4-hidroxi prolina, 5-hidroxi lisina, 3-metil-histidina, N-acetilserina, etc. [21]. Aqueles resíduos de aminoácido que estão derivatizados na sua posição N-alfa encontrar-se-ão apenas localizados na extremidade N-terminal de uma sequência de aminoácidos.

Normalmente, na presente invenção um aminoácido é um L-aminoácido, mas nalgumas formas de realização pode ser um D-aminoácido. Por conseguinte, alteração pode compreender modificar um L-aminoácido em, ou substituí-lo por, um D-aminoácido. São também conhecidas formas metiladas, acetiladas e/ou fosforiladas dos aminoácidos, e os aminoácidos na presente invenção podem ser sujeitos a esse tipo de modificação.

As sequências de aminoácidos nos domínios de anticorpo e membros de ligação da invenção podem compreender os aminoácidos não naturais ou não correntes descritos acima. Nalgumas formas de realização, os aminoácidos não correntes (por exemplo D-aminoácidos) podem ser incorporados numa sequência de aminoácidos durante a síntese, enquanto noutras formas de realização os aminoácidos não correntes podem ser introduzidos por modificação ou substituição dos aminoácidos correntes "originais" após síntese da sequência de aminoácidos.

A utilização de aminoácidos não correntes e/ou não naturais aumenta a diversidade estrutural e funcional, e podem, deste modo, aumentar o potencial para conseguir as propriedades de ligação e neutralização do GM-CSFR α desejadas num membro de ligação da invenção. Além disso, foi demonstrado que os D-aminoácidos e análogos têm melhores perfis farmacocinéticos em comparação com os L-aminoácidos correntes, devido à degradação *in vivo* dos polipéptidos possuindo L-aminoácidos após administração a um animal.

Como assinalado acima, uma sequência de aminoácidos de CDR substancialmente como aqui explicitada é preferencialmente transportada como uma CDR num domínio variável de anticorpo humano ou uma porção substancial do mesmo. As sequências de

HCDR3 substancialmente como aqui explicitadas representam formas de realização preferidas da presente invenção e é preferido que cada uma destas seja transportada como uma HCDR3 num domínio variável de cadeia pesada humana ou numa porção substancial do mesmo.

Os domínios variáveis utilizados na invenção podem ser obtidos ou derivados de qualquer linha germinal ou domínio variável humano rearranjado, ou pode ser um domínio variável sintético baseado em sequências consenso ou reais de domínios variáveis humanos conhecidos. Uma sequência CDR da invenção (por exemplo CDR3) pode ser introduzida num reportório de domínios variáveis que carecem de uma CDR (por exemplo CDR3), utilizando tecnologia de ADN recombinante.

Por exemplo, Marks et al. (1992) [22] descrevem métodos de produção de reportórios de domínios variáveis de anticorpo em que são utilizados iniciadores consenso dirigidos para ou adjacentes à extremidade 5' da área do domínio variável em conjunto com iniciadores consenso para a terceira região estrutural dos genes de VH humano para proporcionar um reportório de domínios variáveis VH que carecem de uma CDR3. Marks et al. descrevem ainda como este reportório pode ser combinado com uma CDR3 de um anticorpo particular. Utilizando técnicas análogas, as sequências derivadas de CDR3 da presente invenção podem ser misturadas de forma aleatória com reportórios de domínios VH ou VL que carecem de uma CDR3, e os domínios VH ou VL completos misturados de forma aleatória combinados com um domínio VL ou VH cognato para proporcionar membros de ligação da invenção. O reportório pode ser depois apresentado num sistema hospedeiro adequado tal como o sistema de apresentação em fago da W092/01047 ou qualquer um de um grande corpo de literatura posterior, incluindo ref. [23], de modo que

possam ser selecionados membros de ligação adequados. Um reportório pode consistir de qualquer coisa como desde 10^4 membros individuais para cima, por exemplo desde 10^6 a 10^8 ou 10^{10} membros. Outros sistemas hospedeiros adequados incluem apresentação em levedura, apresentação bacteriana, apresentação em T7, apresentação viral, apresentação em células, apresentação em ribossomas e apresentação covalente. Técnicas de mistura aleatória ou combinatórias análogas são também divulgadas por Stemmer (1994) [24], o qual descreve a técnica em relação a um gene de β -lactamase mas refere que a abordagem pode ser utilizada para a geração de anticorpos.

Uma outra alternativa consiste em gerar novas regiões VH ou VL portadoras de sequências derivadas de CDR da invenção utilizando mutagênese aleatória de um ou mais genes de VH e/ou VL selecionados para gerar mutações dentro de todo o domínio variável. Uma técnica desse tipo é descrita por Gram et al. (1992) [25], os quais utilizaram PCR propensa a erro. Em formas de realização preferidas são feitas uma ou duas substituições de aminoácidos dentro de um conjunto de HCDRs e/ou LCDRs. Outro método que pode ser utilizado é a mutagênese dirigida a regiões CDR de genes de VH ou VL [26,27].

Um outro aspeto da invenção proporciona um método para produzir uma molécula de anticorpo para GM-CSRF α , como explicitada na reivindicação 13, que compreende proporcionar, por meio de adição, supressão, substituição ou inserção de um ou mais aminoácidos na sequência de aminoácidos de um domínio VH explicitado na reivindicação 13, um domínio VH que é uma variante da sequência de aminoácidos do domínio VH, combinando o domínio VH assim proporcionado com um ou mais domínios VL como explicitados na reivindicação 13, e testando o domínio VH ou combinação

ou combinações VH/VL para identificar um membro de ligação ou um sítio de ligação de antigénio de anticorpo para o antigénio de GM-CSFR α e, opcionalmente, com uma ou mais propriedades preferidas, preferencialmente aptidão para neutralizar a atividade do GM-CSFR α .

Um membro de ligação para o antigénio de GM-CSFR α pode ser preparado por um método compreendendo :

- (a) proporcionar um reportório de partida de ácidos nucleicos que codificam um domínio VH, os quais incluem uma CDR3 a ser substituída ou carecem de uma região de codificação de CDR3;
- (b) combinar o referido reportório com um ácido nucleico dador que codifica uma sequência de aminoácidos substancialmente como aqui explicitada para uma CDR3 de VH de tal forma que o referido ácido nucleico dador é inserido na região CDR3 no reportório, de forma a proporcionar um reportório-produto de ácidos nucleicos que codificam um domínio VH;
- (c) expressar os ácidos nucleicos do referido reportório-produto;
- (d) selecionar um membro de ligação para o GM-CSFR α ; e
- (e) recuperar o referido membro de ligação ou ácido nucleico que o codifica.

Mais uma vez, pode utilizar-se um método análogo em que uma CDR3 de VL da invenção é combinada com um reportório de ácidos nucleicos que codificam um domínio VL que incluem uma CDR3 a ser substituída ou carecem de uma região de codificação de CDR3.

Analogamente, uma ou mais, ou todas as três CDRs podem ser enxertadas num reportório de domínios VH ou VL que são

depois pesquisados quanto a um membro de ligação ou membros de ligação para o GM-CSFR α .

Uma porção substancial de um domínio variável de imunoglobulina compreenderá pelo menos as três regiões de CDR, em conjunto com a suas regiões estruturais intermédias. Preferencialmente, a porção incluirá também pelo menos cerca de 50% de uma ou de ambas das primeira e quarta regiões estruturais, sendo os 50% os 50% da extremidade C-terminal da primeira região estrutural e os 50% da extremidade N-terminal da quarta região estrutural. Os resíduos adicionais na extremidade N-terminal ou C-terminal da parte substancial do domínio variável podem ser aqueles que não estão normalmente associados a regiões naturais do domínio variável. Por exemplo, a construção de membros de ligação da presente invenção feitos por técnicas de ADN recombinante pode resultar na introdução de resíduos N- ou C-terminais codificados por unidades de ligação introduzidas para facilitar a clonagem ou outros passos de manipulação. Os outros passos de manipulação incluem a introdução de unidades de ligação para unir domínios variáveis da invenção a outras sequências de proteínas incluindo regiões constantes de anticorpo, outros domínios variáveis (por exemplo na produção de diacorpos) ou etiquetas detetáveis/funcionais como discutido em mais pormenor aqui noutro sítio.

Sabe-se que domínios de imunoglobulina simples, especialmente domínios VH, são capazes de ligar antigénios alvo. Por exemplo, ver a discussão de dAbs aqui noutro sítio.

No caso de qualquer um dos domínios de ligação individuais, estes domínios podem ser utilizados para seleccionar domínios complementares capazes de formar um membro de

ligação de dois domínios capaz de ligar o GM-CSFR α . Isto pode ser conseguido por métodos de seleção de apresentação em fago utilizando a chamada abordagem combinatória dupla hierárquica como divulgada na W092/01047, na qual uma colónia individual contendo um clone da cadeia H ou L é utilizada para infetar uma biblioteca completa de clones que codificam a outra cadeia (L ou H) e o membro de ligação de duas cadeias resultante é selecionado de acordo com as técnicas de apresentação em fago tais como as descritas nessa referência e [22].

Outros aspetos da presente invenção proporcionam composições contendo membros de ligação da invenção e pelo menos um componente adicional, por exemplo uma composição compreendendo um membro de ligação e um excipiente farmacologicamente aceitável. Tais composições podem ser utilizadas em métodos de inibição ou neutralização de GM-CSFR α , incluindo métodos de tratamento do corpo humano ou animal por terapia.

A invenção proporciona preparações heterogêneas compreendendo moléculas de anticorpo anti-GM-CSFR α . Por exemplo, tais preparações podem ser misturas de anticorpos com cadeias pesadas inteiras e cadeias pesadas que carecem da lisina C-terminal, com vários graus de glicosilação e/ou com aminoácidos derivatizados, tal como ciclização de um ácido glutâmico N-terminal para formar um resíduo de ácido piroglutâmico.

São aqui descritos métodos de tratamento compreendendo a administração de um membro de ligação como proporcionado, composições farmacêuticas compreendendo um tal membro de ligação e a utilização desse membro de ligação no fabrico de um medicamento, por exemplo num método de preparação de um medicamento ou composição farmacêutica compreendendo a

formulação do membro de ligação com um excipiente farmacologicamente aceitável.

O tratamento anti-GM-CSFR α pode ser dado por via oral (por exemplo nanocorpos), por injeção (por exemplo, por via subcutânea, intravenosa, intra-arterial, intra-articular, intraperitoneal ou intramuscular), por inalação, pela via intravesicular (instilação na bexiga urinária) ou por via tópica (por exemplo intraocular, intranasal, retal, em feridas, sobre a pele). O tratamento pode ser administrado por infusão pulsada, particularmente com doses decrescentes do membro de ligação. A via de administração pode ser determinada pelas características físico-químicas do tratamento, por considerações especiais quanto à doença ou pelo requisito de otimizar a eficácia ou minimizar efeitos secundários. Prevê-se que o tratamento anti-GM-CSFR α não se restrinja à utilização clínica. Por conseguinte, é também preferida a injeção subcutânea utilizando um dispositivo sem agulha.

Uma composição pode ser administrada sozinha ou em associação com outros tratamentos, quer simultaneamente ou sequencialmente dependendo da condição a ser tratada. Podem ser utilizados tratamentos de associação para proporcionar efeitos sinérgicos significativos, em particular a associação de um membro de ligação anti-GM-CSFR α com um ou mais de outros fármacos. Um membro de ligação de acordo com a presente invenção pode ser proporcionado em associação ou adicionalmente a um ou mais dos seguintes: NSAIDs (por exemplo inibidores de cox tais como Celecoxib e outros inibidores de cox2 semelhantes), corticosteroides (por exemplo, prednisona) e fármacos antirreumáticos modificadores da doença (DMARDs) por exemplo Humira (adalimumab), metotrexato, Arava, Enbrel (Etanercept), Remicade (Infliximab), Kineret (Anakinra), Rituxan

(Rituximab), Orencia (abatacept), sais de ouro, antimaláricos, sulfassalazina, d-penicilamina, ciclosporina A, diclofenac, ciclofosfamida e azatioprina.

De acordo com a presente invenção, as composições proporcionadas podem ser administradas a indivíduos. A administração é preferencialmente numa "quantidade terapêuticamente eficaz", sendo esta suficiente para mostrar benefícios para um doente. Esse benefício pode ser pelo menos a melhoria de pelo menos um sintoma. A quantidade efetiva administrada, e a taxa e duração da administração, dependerá da natureza e gravidade do que está a ser tratado. A prescrição do tratamento, por exemplo decisão sobre dosagem etc, está dentro da responsabilidade dos clínicos gerais e outros médicos, e pode depender da gravidade dos sintomas e/ou progressão de uma doença a ser tratada. As doses apropriadas de anticorpo são bem conhecidas na técnica [28,29]. Podem ser utilizadas dosagens específicas indicadas aqui ou no Physician's Desk Reference (2003) consoante apropriado para o tipo de medicamento a ser administrado. Uma quantidade terapêuticamente eficaz ou dose adequada de um membro de ligação da invenção pode ser determinada comparando a sua atividade *in vitro* e atividade *in vivo* num modelo animal. Os métodos de extrapolação das dosagens eficazes em ratos e outros animais de ensaio para os humanos são conhecidos. A dose exata dependerá de um número de fatores, incluindo se o anticorpo é para diagnóstico ou para tratamento, o tamanho e localização da área a ser tratada, a natureza exata do anticorpo (por exemplo anticorpo inteiro, fragmento ou diacorpo), e a natureza de qualquer etiqueta detetável ou de outra molécula ligada ao anticorpo. Uma dose de anticorpo típica situar-se-á na gama de 100µg a 1 g para aplicações sistémicas, e 1µg a 1mg para aplicações tópicas. Tipicamente, o anticorpo será um anticorpo

inteiro, preferencialmente IgG1, IgG2 ou mais preferencialmente IgG4. Esta é uma dose para um tratamento único de um doente adulto, que pode ser ajustada proporcionalmente para crianças e bebês, e também ajustada para outros formatos de anticorpo em proporção ao peso molecular. Os tratamentos podem ser repetidos em intervalos diários, de duas vezes por semana, semanais ou mensais, à discricção do médico. Em formas de realização preferidas da presente invenção, o tratamento é periódico e o período entre administrações é de cerca de duas semanas ou mais, preferencialmente cerca de três semanas ou mais, mais preferencialmente cerca de quatro semanas ou mais, ou cerca de uma vez por mês. Noutras formas de realização preferidas da invenção, o tratamento pode ser dado antes e/ou após cirurgia, e, mais preferencialmente, pode ser administrado ou aplicado diretamente no sítio anatómico do tratamento cirúrgico.

Os membros de ligação da presente invenção serão geralmente administrados na forma de uma composição farmacêutica, a qual pode compreender pelo menos um componente além do membro de ligação. Assim, as composições farmacêuticas de acordo com a presente invenção, e para serem utilizadas de acordo com a presente invenção, podem compreender, além do ingrediente ativo, um excipiente, transportador, tampão, estabilizante ou outros materiais farmacêuticamente aceitáveis bem conhecidos dos especialistas na técnica. Esses materiais devem ser não tóxicos e não devem interferir com a eficácia do ingrediente ativo. A natureza exata do transportador ou outro material dependerá da via de administração, a qual pode ser oral ou por injeção, por exemplo intravenosa. As composições farmacêuticas para administração oral podem estar na forma de comprimido, cápsula, pó, líquido ou semissólido. Um comprimido pode compreender um transportador sólido tal como gelatina ou um

adjuvante. As composições farmacêuticas líquidas compreendem geralmente um veículo líquido tal como água, vaselina, óleos animais ou vegetais, óleo mineral ou óleo sintético. Pode ser incluídos soro fisiológico, solução de dextrose ou outro sacárido, ou glicóis tais como etileno glicol, propileno glicol ou polietileno glicol. No caso de injeção intravenosa, ou injeção no sítio afetado, o ingrediente ativo estará na forma de uma solução aquosa aceitável por via parentérica, a qual é apirogénica e tem pH, isotonicidade e estabilidade adequados. Os especialistas com perícia relevante na técnica sabem como preparar soluções adequadas utilizando, por exemplo, veículos isotónicos tais como injeção de Cloreto de Sódio, injeção de Ringer, injeção de Ringer Lactada. Podem ser incluídos conservantes, estabilizantes, tampões, antioxidantes e/ou outros aditivos, consoante necessário. Os membros de ligação da presente invenção podem ser formulados em formas líquidas, semissólidas ou sólidas dependendo das propriedades físico-químicas da molécula e da via de administração. As formulações podem incluir excipientes, ou associações de excipientes, por exemplo: açúcares, aminoácidos e tensioativos. As formulações líquidas podem incluir uma vasta gama de concentrações de anticorpo e pH. As formulações sólidas podem ser produzidas, por exemplo, por liofilização, secagem por pulverização ou secagem por tecnologia de fluido supercrítico. As formulações de anti-GM-CSFR α dependerão da via de administração pretendida: por exemplo, as formulações para administração pulmonar podem consistir de partículas com propriedades físicas que garantem a penetração no pulmão profundo após inalação; as formulações tópicas podem incluir agentes de modificação da viscosidade, que prolongam o tempo que o fármaco reside no sítio de ação. Em certas formas de realização, o membro de ligação pode ser preparado com um veículo que protegerá o

membro de ligação contra libertação rápida, tal como uma formulação de libertação controlada, incluindo implantes, adesivos transdérmicos e sistemas de administração microencapsulados. Podem ser utilizados polímeros biocompatíveis, biodegradáveis, tais como acetato de vinilo etileno, polianidridos, poli(ácido glicólico), colagénio, poliortoésteres e poli(ácido láctico). Muitos métodos para a preparação de tais formulações são conhecidos dos especialistas na técnica. Ver, por exemplo, Robinson, 1978 [30].

Os membros de ligação de acordo com a invenção podem ser utilizados num método de tratamento ou diagnóstico do corpo humano ou animal, tal como um método de tratamento (o qual pode incluir tratamento profilático) de uma doença ou distúrbio num doente humano, o qual compreende administrar ao referido doente uma quantidade eficaz de um membro de ligação da invenção. As condições que podem ser tratadas de acordo com a presente invenção incluem qualquer uma em que o GM-CSFR α desempenha um papel. A literatura técnica publicada indica um papel para o GM-CSF em várias doenças e condições, como se resume abaixo. Uma vez que o GM-CSF se liga especificamente ao GM-CSFR α , os efeitos patológicos e/ou sintomáticos do GM-CSF podem ser neutralizados inibindo a ligação do GM-CSF ao GM-CSFR α . Assim, a evidência publicada, além dos dados farmacológicos *in vivo* e *in vitro* apresentados para as moléculas de anticorpo aqui descritas na Parte Experimental, indica que os membros de ligação da invenção podem ser utilizados no tratamento de condições, doenças e distúrbios autoimunes e/ou inflamatórios, por exemplo artrite reumatoide, asma, resposta alérgica, esclerose múltipla, leucemia mieloide e aterosclerose. A evidência publicada sobre estas condições é resumida abaixo:

Asma e Respostas Alérgicas

A asma brônquica é um distúrbio inflamatório persistente comum do pulmão, que se caracteriza por hipersensibilidade das vias aéreas, produção excessiva de muco, fibrose e níveis elevados de IgE. A hipersensibilidade das vias aéreas (AHR) é a constrição exagerada das vias aéreas a estímulos não específicos. Julga-se que tanto a AHR como a produção excessiva de muco sejam responsáveis pela obstrução variável das vias aéreas que leva às características de falta de ar dos ataques de asma (exacerbações) e que é responsável pela mortalidade associada a esta doença (cerca de 2000 mortes/ano no Reino Unido).

Estudos recentes demonstraram que o GM-CSF e o seu recetor estão regulados positivamente tanto ao nível da proteína como do ARNm na asma. Além disso, os níveis de expressão correlacionam com a gravidade da doença. Foi medido um aumento de produção de GM-CSF no líquido de lavagem broncoalveolar (BAL), células do BAL, expectoração, células epiteliais bronquiolares e células mononucleares de sangue periférico estimuladas com antígeno de doentes asmáticos quando comparado com indivíduos não asmáticos [31,32]. Além disso foi demonstrado que o nível de expressão de GM-CSF nas vias aéreas após exposição a alérgeno correlaciona com o grau de eosinofilia tecidual e a gravidade da resposta asmática de fase tardia [33]. Estudos posteriores relacionaram a expressão regulada positivamente do GM-CSFR com asma intrínseca ou não atópica, correlacionando os níveis de expressão com os dados da função pulmonar [34]. Num modelo de rato de exposição e sensibilização à ovalbumina, a neutralização da atividade do GM-CSF com um anticorpo policlonal de cabra, por administração intranasal antes da exposição à ovalbumina, preveniu a

hipersensibilidade das vias aéreas e reduziu tanto a infiltração de eosinófilos como a secreção de muco nas vias aéreas [35]. Analogamente, num modelo de rato de doença respiratória alérgica iniciada pela administração intranasal de partículas de exaustão de diesel, a neutralização do GM-CSF mais uma vez pela administração intranasal de um anticorpo policlonal de cabra preveniu a hipersensibilidade das vias aéreas à metacolina, reduziu a contagem de eosinófilos no BAL e também diminuiu a expressão de células caliciformes produtoras de muco no epitélio das vias aéreas [36].

O papel do GM-CSF nas respostas alérgicas foi ainda investigado em modelos murídeos de tolerância induzida. Ratos expostos a doses diárias repetidas de ovalbumina nebulizada sem sensibilização anterior desenvolvem tolerância à ovalbumina e não desencadeiam inflamação eosinofílica das vias aéreas. A expressão pulmonar de GM-CSF via uma construção adenoviral altera as respostas destes animais e favorece o influxo de eosinófilos para o BAL, a geração de histologia fenotipicamente alérgica e hiperplasia associada das células caliciformes. Esta geração de uma resposta Th2 típica é ainda evidenciada pelo aumento das concentrações de IL-5 no soro e BAL e de IL-4 no soro. Trabalho adicional neste modelo, utilizando um rato com MHC II anulada indica que o GM-CSF modula a interação entre as células apresentadoras de antígeno e as células T nas vias aéreas, facilitando desse modo as respostas mediadas por células T à ovalbumina [37]. De modo significativo, a atividade do GM-CSF como um ativador potente de respostas Th2 também pode ser demonstrada em ratos que carecem de IL-13 e/ou IL-4, indicando que a neutralização da atividade do GM-CSF apresenta uma via terapêutica alternativa distinta da atividade destas citocinas.

Foram feitas observações semelhantes noutro modelo murídeo em que a exposição intranasal repetida a tasneira resulta em sensibilização de tipo Th2 e inflamação ligeira das vias aéreas quando da reexposição ao antigénio [38]. A administração de anticorpos anti-GM-CSF em conjunto com a tasneira diminui a produção de citocinas associadas à Th2, presumivelmente pela inibição do GM-CSF endógeno. Em contraste, a administração de tasneira a um microambiente das vias aéreas enriquecido com GM-CSF, quer por coadministrações múltiplas de GM-CSF recombinante ou uma administração única de um vetor adenoviral portador do transgene de GM-CSF, resultou em inflamação eosinofílica das vias aéreas consideravelmente aumentada e respostas de memória de Th2 específicas para a tasneira.

Artrite Reumatoide (RA)

A RA é uma doença articular inflamatória e destrutiva crónica que afeta aproximadamente 1% da população do mundo industrializado. A RA caracteriza-se por hiperplasia e inflamação da membrana sinovial, inflamação no líquido sinovial e destruição progressiva do osso e cartilagem circundantes que conduz geralmente a incapacidade significativa.

Embora a causa da RA permaneça desconhecida, há evidência acumulada para o papel do GM-CSF na progressão da RA. Julga-se que a RA é iniciada e conduzida através de um processo específico ao antigénio, mediado por células T. Em resumo, julga-se que a presença de um antigénio não identificado num hospedeiro suscetível inicia uma resposta de células T que leva à produção de citocinas de células T com o recrutamento consequente de células inflamatórias, incluindo neutrófilos, macrófagos e células B.

Muitas citocinas pró- e anti-inflamatórias são produzidas na articulação reumatoide. Além do mais, a progressão, reativação e silenciamento da doença são mediados via alterações dinâmicas na produção de citocinas dentro da articulação. Em particular, considera-se que o TNF- α e a IL-1 exercem papéis essenciais na patogênese da RA e muitas das terapias desenvolvidas mais recentes, ou em desenvolvimento, para a doença visam inibir a atividade destas duas citocinas pró-inflamatórias.

Estudos recentes em modelos de roedores sugeriram um papel central e não redundante para o GM-CSF no desenvolvimento e progressão da RA. A administração de GM-CSF recombinante exógeno intensifica a patologia em dois modelos de rato diferentes de artrite RA induzida por colagénio (CIA) [39] e num modelo de artrite monoarticular [40]. Além disso foi demonstrado que ratos com GM-CSF anulado (GM-CSF^{-/-}) são resistente ao desenvolvimento de CIA e que os níveis de IL-1 e do fator de necrose tumoral (TNF α) encontrados no líquido sinovial da articulação estavam reduzidos em comparação com os ratos de tipo selvagem [41,42]. Analogamente, a indução de monoartrite utilizando injeção intra-articular de albumina de soro bovino metilada e IL-1 em ratos GM-CSF^{-/-} resulta em gravidade de doença reduzida em comparação com os ratos de tipo selvagem [43].

Além disso, a administração de mAb murídeo anti-GM-CSF melhora significativamente a gravidade da doença em modelos de CIA e artrite monoarticular. No modelo de CIA, o tratamento com mAb foi eficaz no tratamento da progressão de doença estabelecida, histopatologia e reduziu significativamente os níveis de IL-1 e TNF- α na articulação. Além disso, o tratamento com mAb antes do

início da artrite diminuiu a gravidade da doença de CIA [44,43].

Um número de estudos analisou os níveis de citocinas e recetores presentes em amostras de líquido sinovial artrítico e biópsia da membrana de tecido humano. As células mononucleares circulantes em 27 doentes com RA, 13 voluntários saudáveis e 14 doentes com osteoporose foram avaliadas quanto aos níveis de GM-CSFR utilizando GM-CSF marcado com PE [45]. Neste estudo foi demonstrado que foi detetado o dobro das células positivas para recetor em doentes com RA (53%), em comparação com controlos saudáveis (20%) e doentes sujeitos a investigação no que se refere à osteoporose (25%), sugerindo com isso que os monócitos podem ser preparados para responder a GM-CSF produzido localmente. A expressão de genes de citocinas a partir de doentes com RA [46] utilizando hibridização *in situ* de células SF demonstrou níveis elevados de GM-CSF, IL-1, TNF- α e IL-6. Além disso, sinoviócitos derivados de fibroblastos isolados e cultivados de voluntários normais demonstraram níveis elevados de proteína de GM-CSF em resposta a IL-1 α , IL-1 β , TNF- α e TNF- β [47]. A quantificação dos níveis de GM-CSF no soro em doentes com RA [48] mostrou que os níveis de proteína estavam aumentados em doentes com RA grave (366 pg/mL, n=26) e moderada (376 pg/mL, n=58) em comparação com o grupo de controlo (174 pg/mL, n=43), além disso foi também mostrado que o GM-CSF estava significativamente aumentado nas SF de doentes com RA (1300 pg/mL).

Foi anteriormente observado que a administração de GM-CSF recombinante a doentes que estão a ser tratados para a neutropenia poderia provocar uma exacerbação da RA [49]. Foram feitas observações semelhantes para um doente com

síndrome de Felty após tratamento com GM-CSF recombinante [50].

Doença Pulmonar Obstrutiva Crónica (COPD)

A Doença Pulmonar Obstrutiva Crónica (COPD) é definida como um estado patológico caracterizado por limitação do fluxo de ar que não é completamente reversível. A limitação de fluxo de ar crónica é geralmente progressiva e associada a uma resposta inflamatória anormal dos pulmões a partículas ou gases nocivos. Esta limitação de fluxo de ar é provocada por uma mistura de doença das vias aéreas pequenas (bronquiolite obstrutiva) e destruição do parênquima (enfisema), cujas contribuições relativas variam de pessoa para pessoa. Os sintomas característicos resultantes da COPD são tosse, produção de expetoração e dispneia ao exercício. A COPD é um problema de saúde pública importante e é a quarta causa principal de morbilidade crónica e mortalidade nos EUA. A doença é atualmente tratada com fármacos originariamente desenvolvidos para a asma tais como os corticosteroides orais ou inalados com ou sem broncodilatadores incluindo agonistas β . No entanto, nenhum destes fármacos mostrou abrandar a progressão da COPD [51]. Por exemplo, os corticosteroides que suprimem acentuadamente a inflamação eosinofílica na asma não parecem ter qualquer efeito na inflamação observada na COPD, a qual é predominantemente mediada por neutrófilos [52]. Por conseguinte, há uma necessidade de desenvolver novos tratamentos para a COPD que visem especificamente os processos inflamatórios subjacentes à fisiopatologia desta doença. O GM-CSF, através do seu papel na função de neutrófilos e macrófagos, pode desempenhar um papel importante na patogénese da COPD.

Num estudo utilizando PCR quantitativa foi demonstrado que o número de cópias de GM-CSF na expetoração de fumadores com COPD versus expetoração de fumadores não obstruídos com idade condizente estava significativamente aumentado [53]. Além disso, num modelo de roedor de inflamação pulmonar induzida por fumo de cigarro, animais tratados por via intranasal com um anticorpo contra o GM-CSF 2 dias, 4 h e 1 h antes da exposição ao fumo demonstraram uma redução significativa nos níveis de neutrófilos, macrófagos e MMP-9 do BAL quando comparados com o anticorpo de controlo de isotipo 5 dias após exposição [54]. Estes estudos são também corroborados pelas nossas próprias observações ao investigar os níveis de GM-CSF em expetoração induzida de doentes com uma gama de gravidades de COPD. Nestes estudos nós mostramos que o GM-CSF era elevado na expetoração de aproximadamente 40% dos doentes com COPD testados independentemente da gravidade da doença, com níveis de GM-CSF que se aproximavam dos 500pg/mL em alguns casos. O GM-CSF não parecia estar aumentado em doentes de controlo não fumadores e fumadores equiparados. Estes dados sugerem que o GM-CSF pode ser um dos mediadores chave na inflamação das vias aéreas induzida por fumo e COPD.

Esclerose múltipla (MS)

O GM-CSF foi implicado na doença autoimune esclerose múltipla. Através da administração de antigénio de glicoproteína de oligodendrócitos de mielina (MOG) a roedores pode ser induzido um modelo de esclerose múltipla humana que demonstra muitos dos fenótipos de MS, tal como a inflamação e desmielinização do sistema nervoso central que pode resultar numa paralisia semelhante à MS. Em ratos sem GM-CSF, a MOG foi incapaz de induzir o fenótipo EAE [55]. Além disso, foi demonstrado que estes ratos tinham uma menor proliferação de células T relativamente ao antigénio

de MOG e uma menor produção das citocinas de Th1, IL-6 e IFN- γ . A administração de anticorpos neutralizantes de GM-CSF ao mesmo tempo que a exposição ao antigénio preveniu o início da doença durante 10 dias após tratamento com evidência de lesões reduzidas. Se administrados após o início da doença, os ratos recuperaram completamente em menos de 20 dias de tratamento [55].

Leucemia

O GM-CSF foi também implicado na leucemia mieloide, leucemia mieloide crónica juvenil (JCML). Esta condição é um distúrbio mieloproliferativo que afeta principalmente doentes com menos de 4 anos de idade. Os progenitores de granulócitos-macrófagos do sangue periférico (CFU-GM) de JCML *in vitro* demonstram proliferação espontânea a densidades celulares baixas, uma observação que não tinha sido anteriormente descrita para outros distúrbios mieloproliferativos. Além disso, a depleção de monócitos destas culturas anulou esta proliferação. Foi subsequentemente demonstrado que esta proliferação espontânea é mediada via uma hipersensibilidade dos progenitores de JCML à citocina derivada de monócitos GM-CSF [56,57,58,59,60,61]. Ao invés de uma produção excessiva ou níveis elevados de GM-CSF em doentes com JCML, a hipersensibilidade dos progenitores de JCML parece ocorrer através de uma via de transdução de sinal Ras induzida por GM-CSF desregulada [62]. Estudos recentes com um análogo de GM-CSF (E21R), que antagoniza a ação de GM-CSF em estudos de ligação e ensaios funcionais, mostrou que ao inibir a ação do GM-CSF é possível reduzir significativamente a carga de células JCML num modelo de xenoinxerto de JCML em rato imunodeficiente / diabético obeso combinado grave (SCID/NOD) [63]. A administração sistémica profilática de E21R na altura do enxerto impediu que os progenitores de

JCML se estabelecessem na medula óssea e a administração de E21R 4 semanas após o enxerto induziu a remissão de JCML, com uma redução da carga celular. Além disso, a administração de E21R a ratos SCID/NOD co-enxertados com medula óssea humana normal e medula óssea com JCML provocou uma redução da carga de JCML, contudo as células da medula óssea normal permaneceram não afetadas.

Aterosclerose

A doença cardíaca isquémica é a causa mais comum de morte em todo o mundo. Nos últimos anos tem aumentado o conceito de que a inflamação desempenha um papel significativo na patogénese da aterosclerose, ocorrendo a acumulação de células inflamatórias a par com a acumulação de lípidos nas paredes das artérias.

Uma vez residentes na parede arterial, as células inflamatórias, tais como os monócitos e macrófagos, participam e perpetuam a resposta inflamatória local. Estes macrófagos também expressam recetores de depuração para uma gama de lipoproteínas e contribuem, deste modo, para a diferenciação das células em 'células vacuolizadas'. É a morte destas 'células vacuolizadas' que contribui para o desenvolvimento do núcleo lipídico, uma característica clássica destas lesões. À medida que a inflamação prossegue nestas placas ateroscleróticas, estas células inflamatórias ativadas libertam mediadores fibrogénicos e fatores de crescimento que promovem a proliferação de células do músculo liso (SMC) e a fibrose da placa. Além de promover a fibrose, estas células também libertam enzimas proteolíticas, tais como metaloproteinases da matriz (MMPs), que contribuem para um enfraquecimento da placa fibrótica, tornando-as assim propensas a rutura. Uma vez rompidas, estas placas libertam fragmentos celulares e

fatores de coagulação, tal como o fator tecidual, para os vasos sanguíneos estimulando a cascata de coagulação e o desenvolvimento de trombos. A trombose arterial resultante pode depois levar a isquemia ou enfarte do miocárdio.

Recentemente, o GM-CSF foi implicado em muitos aspetos da progressão da doença na aterosclerose. Nas lesões ateroscleróticas de coelhos alimentados com colesterol, constatou-se que o GM-CSF se co-localiza com macrófagos e, em menor grau, com células endoteliais e SMC [64]. Além disso, demonstrou-se também que a expressão de GM-CSF está aumentada em vasos ateroscleróticos humanos nos sítios de acumulação de macrófagos e em SMCs centrais e células endoteliais [65]. Este aumento dos níveis de GM-CSF é atribuído, em parte, ao contacto direto célula-célula de monócitos/macrófagos e células endoteliais durante a formação e patogénese da lesão aterosclerótica [66]. Outro elemento chave na lesão aterótica é a 'célula vacuolizada', isto é macrófagos que captaram lipoproteínas de baixa densidade (LDL) oxidadas via recetores de depuração na superfície. In vitro, esta captação de LDL-Ox pode estimular ainda mais os macrófagos para proliferar via um mecanismo dependente de GM-CSF [67]. Como a aterosclerose é um processo inflamatório crónico foram investigados agentes anti-inflamatórios tais como os glucocorticoides. A dexametasona, um glucocorticoide anti-inflamatório, suprime o desenvolvimento de aterosclerose em vários modelos animais experimentais [68,69,70,71]. A eficácia da mesma foi atribuída à inibição da migração [72] e proliferação [73] de SMC, e à redução da quimiotaxia dos monócitos e leucócitos circulantes [74]. Estudos recentes mostraram que a LDL-ox pode induzir a libertação de GM-CSF a partir de macrófagos peritoneais de rato [75]. Além disso, após tratamento com dexametasona, esta libertação de GM-CSF foi inibida de forma dependente com a dose, sugerindo que os

efeitos anti-inflamatórios da dexametasona são mediados pela inibição da produção de GM-CSF induzida pela LDL-ox. Como o GM-CSF parece ter um papel central na aterosclerose, uma alternativa aos glucocorticoides poderia ser a inibição da atividade do GM-CSF nesta indicação.

Terminologia

"E/ou" onde aqui utilizado é para ser considerado como uma divulgação específica de cada uma das duas características ou componentes especificados com ou sem o outro. Por exemplo "A e/ou B" é para ser considerado como uma divulgação específica de cada um de (i) A, (ii) B e (iii) A e B, como se cada um fosse aqui explicitado individualmente.

GM-CSFR α e GM-CSF

GM-CSFR α é a cadeia alfa do recetor para o fator de estimulação de colónias de granulócitos macrófagos. A sequência inteira do GM-CSFR α humano encontra-se depositada sob o Número de acesso S06945 (gi:106355) [76] e é aqui explicitada como SEQ ID NO: 202. A forma madura do GM-CSFR α humano, isto é, com o péptido sinal dissociado, é aqui explicitada como SEQ ID NO: 206. Salvo indicação em contrário pelo contexto, as referências aqui a GM-CSFR α referem-se ao GM-CSFR α humano ou de primata não humano (por exemplo cynomolgus), normalmente humano. O GM-CSFR α pode ser GM-CSFR α natural ou GM-CSFR α recombinante.

O domínio extracelular com 298 aminoácidos do recetor de GM-CSF α humano tem a sequência de aminoácidos SEQ ID NO: 205.

Salvo indicação em contrário pelo contexto, as referências aqui a GM-CSF referem-se ao GM-CSF humano ou de primata não humano (por exemplo cynomolgus), normalmente humano.

O GM-CSF liga-se normalmente ao domínio extracelular (SEQ ID NO: 205) da cadeia alfa do recetor de GM-CSF maduro (SEQ ID NO: 206). Como descrito aqui noutro sítio, esta ligação é inibida pelo membros de ligação da invenção.

Foram identificadas variantes de excisão-união naturais do GM-CSFR α - ver, por exemplo, refs. [77 e 78]. O domínio extracelular é altamente conservado nestas variantes de excisão-união. Os membros de ligação da invenção podem, ou não, ligar-se a uma ou mais variantes de excisão-união do GM-CSFR α , e podem, ou não, inibir a ligação do GM-CSF a uma ou mais variantes de excisão-união do GM-CSFR α .

Membro de ligação

Isto descreve um membro de um par de moléculas que se ligam uma à outra. Os membros de um par de ligação podem ser derivados naturalmente ou produzidos total ou parcialmente por via sintética. Um membro do par de moléculas tem uma área na sua superfície, ou uma cavidade, que se liga e é, portanto, complementar a uma organização espacial e polar particular do outro membro do par de moléculas. Os exemplos de tipos de pares de ligação são antigénio-anticorpo, biotina-avidina, hormona-recetor da hormona, recetor-ligando, enzima-substrato. A presente invenção refere-se a reacções de tipo antigénio-anticorpo.

Um membro de ligação de acordo com a invenção compreende uma molécula de anticorpo que compreende um sítio de ligação de antigénio.

Além das sequências de anticorpo e/ou um sítio de ligação de antigénio, um membro de ligação de acordo com a presente invenção pode compreender outros aminoácidos, por exemplo para formar um péptido ou polipéptido, tal como um domínio dobrado, ou para conferir à molécula outra característica funcional além da aptidão para ligar o antigénio. Os membros de ligação da invenção podem ter uma etiqueta detetável, ou podem ser conjugados com um toxina ou uma unidade de orientação ou enzima (por exemplo via uma ligação peptídico ou unidade de ligação). Por exemplo, um membro de ligação pode compreender um sítio catalítico (por exemplo, num domínio enzimático) bem como um sítio de ligação de antigénio, em que o sítio de ligação de antigénio se liga ao antigénio e direciona, deste modo, o sítio catalítico para o antigénio. O sítio catalítico pode inibir a função biológica do antigénio, por exemplo, por dissociação.

Embora, como referido, as CDRs possam ser transportadas por armações tais como fibronectina ou citocromo B [80, 81, 82], a estrutura para transportar uma CDR ou um conjunto de CDRs da invenção será geralmente de uma sequência de cadeia pesada ou leve do anticorpo ou uma porção substancial da mesma em que a CDR ou conjunto de CDRs está localizado num local correspondente à CDR ou conjunto de CDRs dos domínios variáveis VH e VL naturais de anticorpo codificados por genes de imunoglobulina rearranjados. As estruturas e localizações dos domínios variáveis de imunoglobulina podem ser determinadas por referência a (Kabat, et al., 1987 [98], e atualizações da mesma, agora disponíveis na Internet (<http://immuno.bme.nwu.edu> ou pesquisar "Kabat" utilizando qualquer motor de busca).

Os membros de ligação da presente invenção podem compreender regiões constantes de anticorpos ou partes das

mesmas, preferencialmente regiões constantes de anticorpos humanos ou partes das mesmas. Por exemplo, um domínio VL pode estar ligado na sua extremidade C-terminal aos domínios constantes da cadeia leve de anticorpo incluindo as cadeias C κ ou C λ humanas, preferencialmente cadeias C λ . Analogamente, um membro de ligação baseado num domínio VH pode estar ligado na sua extremidade C-terminal à totalidade ou parte (por exemplo um domínio CH1) de uma cadeia pesada de imunoglobulina derivada de qualquer isotipo de anticorpo, por exemplo IgG, IgA, IgE e IgM e de qualquer uma das subclasses de isotipo, em particular IgG1, IgG2 e IgG4. É preferida a IgG1, IgG2 ou IgG4. A IgG4 é preferida porque não se liga ao complemento e não cria funções efetoras. Qualquer variante sintética ou outra da região constante que possua estas propriedades e estabilize as regiões variáveis também é preferida para ser utilizada em formas de realização da presente invenção.

Os membros de ligação da invenção podem ser marcados com uma etiqueta detetável ou funcional. As etiquetas detetáveis incluem etiquetas radioativas tais como ^{131}I ou ^{99}Tc , as quais podem ser ligadas aos anticorpos da invenção utilizando química convencional conhecida na técnica de visualização de anticorpos. As etiquetas incluem também etiquetas enzimáticas, tal como a peroxidase de rábano silvestre. As etiquetas incluem ainda unidades químicas tais como biotina que podem ser detetadas via ligação a uma unidade detetável cognata específica, por exemplo avidina marcada. Assim, um membro de ligação ou molécula de anticorpo da presente invenção pode estar na forma de um conjugado compreendendo o membro de ligação e uma etiqueta, opcionalmente ligada através de uma unidade de ligação tal como um péptido. O membro de ligação pode ser conjugado, por exemplo, com enzimas (por exemplo peroxidase, fosfatase alcalina) ou com uma etiqueta fluorescente incluindo, mas

não se limitando a, biotina, fluorocromo, proteína fluorescente verde. Além disso, a etiqueta pode compreender uma unidade de toxina tal como uma unidade de toxina selecionada de um grupo de exotoxina de *Pseudomonas* (PE ou um fragmento citotóxico ou mutante da mesma), toxina da Difteria (um fragmento citotóxico ou mutante da mesma), uma toxina botulínica de A a F, ricina ou um fragmento citotóxico da mesma, abrina ou um fragmento citotóxico da mesma, saporina ou um fragmento citotóxico da mesma, toxina antiviral da erva-tintureira ou um fragmento citotóxico da mesma e briodina 1 ou um fragmento citotóxico da mesma. Nos casos em que o membro de ligação compreende uma molécula de anticorpo, o membro de ligação marcado pode ser referido como um imunocjugado.

Molécula de anticorpo

Isto descreve uma imunoglobulina natural ou produzida parcial ou totalmente por via sintética. O termo também abrange qualquer polipéptido ou proteína compreendendo um sítio de ligação de antígeno de anticorpo. Os fragmentos de anticorpo que compreendem um sítio de ligação de antígeno de anticorpo são moléculas tais como Fab, F(ab')₂, Fab', Fab'-SH, scFv, Fv, dAb, Fd; e diacorpos.

É possível selecionar anticorpos monoclonais e outros e utilizar técnicas de tecnologia de ADN recombinante para produzir outros anticorpos ou moléculas quiméricas que retêm a especificidade do anticorpo original. Tais técnicas podem envolver a introdução de ADN que codifica a região variável de imunoglobulina, ou as CDRs, de um anticorpo nas regiões constantes, ou regiões constantes mais regiões estruturais, de uma imunoglobulina diferente. Ver, por exemplo, EP-A-184187, GB 2188638A ou EP-A-239400, e um grande corpo de literatura posterior. Um hibridoma ou outra

célula que produz um anticorpo pode ser submetida a mutação genética ou outras alterações, as quais podem, ou não, alterar a ligação ao alvo dos anticorpos produzidos.

Como os anticorpos podem ser modificados de um número de maneiras, o termo "molécula de anticorpo" deve ser interpretado como abrangendo qualquer membro de ligação ou substância possuindo um sítio de ligação de antigénio de anticorpo. Assim, este termo abrange fragmentos e derivados de anticorpo, incluindo qualquer polipéptido compreendendo um sítio de ligação de antigénio de anticorpo, quer natural ou total ou parcialmente sintético. Portanto, estão incluídas moléculas quiméricas compreendendo um sítio de ligação de antigénio de anticorpo, ou equivalentes, fundidas com outro polipéptido. A clonagem e expressão de anticorpos quiméricos são descritas em EP-A-0120694 e EP-A-0125023, e um grande corpo de literatura posterior.

Outras técnicas disponíveis na técnica de manipulação de anticorpos tornaram possível isolar anticorpos humanos e humanizados. Os anticorpos humanos e humanizados são formas de realização preferidas da invenção, e podem ser produzidos utilizando qualquer método adequado. Por exemplo, podem ser preparados hibridomas humanos [83]. A apresentação em fago, outra técnica estabelecida para gerar membros de ligação foi descrita em pormenor em muitas publicações tais como a ref. [83] e W092/01047 (discutida mais abaixo). Ratos transgénicos em que os genes de anticorpo de rato são inativados e substituídos funcionalmente por genes de anticorpo humano, enquanto se deixam intactos outros componentes do sistema imunitário do rato, podem ser utilizados para isolar anticorpos humanos [84]. Os anticorpos humanizados podem ser produzidos utilizando técnicas conhecidas na técnica tais como aquelas divulgadas, por exemplo, em W091/09967, US 5,585,089,

EP592106, US 565,332 e WO93/17105. Além disso, a WO2004/006955 descreve métodos para humanizar anticorpos, com base na seleção de sequências estruturais da região variável de genes de anticorpo humano comparando tipos estruturais canônicos de CDR para sequências de CDR da região variável de um anticorpo não humano com tipos estruturais canônicos de CDR para as CDRs correspondentes de uma biblioteca de sequências de anticorpos humanos, por exemplo segmentos de genes de anticorpos de linha germinal. As regiões variáveis de anticorpos humanos que têm tipos estruturais canônicos de CDR semelhantes às CDRs não humanas formam um subconjunto de sequências de anticorpos humanos do membro, a partir do qual se seleciona as sequências estruturais humanas. Os membros do subconjunto podem ser ainda classificados por semelhança de aminoácidos entre as sequências da CDR humana e não humana. No método da WO2004/006955, as sequências humanas com melhor classificação são selecionadas para proporcionar as sequências estruturais para construir um anticorpo quimérico que substitui funcionalmente as sequências da CDR humana pelas CDR não humanas correspondentes utilizando as estruturas humanas do membro do subconjunto selecionado, proporcionando desse modo um anticorpo humanizado com alta afinidade e baixa imunogenicidade sem a necessidade de comparar as sequências estruturais entre os anticorpos não humanos e humanos. São também divulgados anticorpos quiméricos preparados de acordo com o método.

As moléculas de anticorpo sintético podem ser criadas pela expressão de genes gerados por meio de oligonucleótidos sintetizados e reunidos dentro de vetores de expressão adequados [85, 86].

Foi demonstrado que fragmentos de um anticorpo inteiro podem realizar a função de ligação de antígenos. Os

exemplos de fragmentos de ligação são (i) o fragmento Fab consistindo dos domínios VL, VH, CL e CH1; (ii) o fragmento Fd consistindo dos domínios VH e CH1; (iii) o fragmento Fv consistindo dos domínios VL e VH de um único anticorpo; (iv) o fragmento dAb [87, 88, 89] o qual consiste de um domínio VH ou um domínio VL; (v) regiões de CDR isoladas; (vi) fragmentos $F(ab')_2$, um fragmento divalente compreendendo dois fragmentos Fab ligados (vii) moléculas de Fv de cadeia simples (scFv), em que um domínio VH e um domínio VL estão ligados por uma unidade de ligação peptídica que permite que os dois domínios se associem para formar um sítio de ligação de antigénio [90, 91]; (viii) dímeros de Fv de cadeia simples biespecíficos (PCT/US92/09965) e (ix) "diacorpos", fragmentos multivalentes ou multiespecíficos construídos por fusão de genes (WO94/13804; [92]). As moléculas de Fv, scFv ou diacorpo podem ser estabilizadas pela incorporação de pontes de dissulfureto a ligar os domínios VH e VL [93]. Podem ser também preparados minicorpos compreendendo um scFv ligado a um domínio CH3 [94].

Um dAb (anticorpo de domínio) é um pequeno fragmento monomérico de ligação de antigénio de um anticorpo, nomeadamente a região variável de uma cadeia pesada ou leve do anticorpo [89]. Os dAbs de VH ocorrem naturalmente em camelídeos (por exemplo, camelo, lama) e podem ser produzidos imunizando um camelídeo com um antigénio alvo, isolando células B específicas para o antigénio e clonando diretamente os genes de dAb de células B individuais. Os dAbs também podem ser produzidos em culturas de células. O seu tamanho pequeno, boa solubilidade e estabilidade à temperatura torna-os particularmente úteis em termos fisiológicos e adequados para seleção e maturação por afinidade. Um membro de ligação da presente invenção pode ser um dAb compreendendo um domínio VH ou VL

substancialmente como aqui explicitado, ou um domínio VH ou VL compreendendo um conjunto de CDRs substancialmente como aqui explicitado. Por "substancialmente como explicitado" entende-se que a CDR ou o domínio VH ou VL relevante da invenção será idêntico ou altamente semelhante às regiões especificadas cuja sequência é aqui explicitada. Por "altamente semelhante" considera-se que podem ser feitas desde 1 a 5, preferencialmente desde 1 a 4, tal como 1 a 3 ou 1 ou 2, ou 3 ou 4, substituições de aminoácidos na CDR e/ou no domínio VH ou VL.

Nos casos em que forem utilizados anticorpos biespecíficos, estes podem ser anticorpos biespecíficos convencionais, os quais podem ser fabricados de várias maneiras [95], por exemplo preparados quimicamente ou a partir de hibridomas híbridos, ou podem ser quaisquer dos fragmentos de anticorpo biespecífico mencionados acima. Os exemplos de anticorpos biespecíficos incluem aqueles da tecnologia BiTE™ em que podem ser utilizados os domínios de ligação de dois anticorpos com especificidade diferente e ligados diretamente através de péptidos flexíveis curtos. Esta combina dois anticorpos numa única cadeia polipeptídica curta. Os diacorpos e scFv podem ser construídos sem uma região Fc, utilizando apenas os domínios variáveis, reduzindo potencialmente os efeitos de reação anti-idiotípica.

Os diacorpos biespecíficos, por oposição aos anticorpos inteiros biespecíficos, também podem ser particularmente úteis porque podem ser facilmente construídos e expressados em *E.coli*. Os diacorpos (e muitos outros polipéptidos tais como fragmentos de anticorpo) com especificidades de ligação apropriadas podem ser facilmente selecionados utilizando apresentação em fago (W094/13804) de bibliotecas. Se um braço do diacorpo tiver de ser mantido

constante, por exemplo, dirigido contra GM-CSFR α , pode ser então preparada uma biblioteca em que o outro braço é modificado e selecionado um anticorpo de ligação ao alvo apropriado. Os anticorpos inteiros biespecíficos podem ser preparados por engenharia botões-em-buracos [96].

Sítio de ligação de antigénio

Isto descreve a parte de uma molécula que se liga e é complementar a todo ou parte do antigénio alvo. Numa molécula de anticorpo, é referido como o sítio de ligação de antigénio de anticorpo, e compreende a parte do anticorpo que se liga e é complementar a todo ou parte do antigénio alvo. No caso de um antigénio ser grande, um anticorpo pode ligar-se apenas a uma parte particular do antigénio, parte essa que é denominada um epítopo. Um sítio de ligação de antigénio de anticorpo pode ser proporcionado por um ou mais domínios variáveis de anticorpo. Preferencialmente, um sítio de ligação de antigénio de anticorpo compreende uma região variável da cadeia leve (VL) de anticorpo e uma região variável da cadeia pesada (VH) de anticorpo.

Numeração de Kabat

Os resíduos das sequências de anticorpo são aqui geralmente referidos utilizando a numeração de Kabat como definida em Kabat et al., 1971 [97]. Ver também refs. [98, 99].

Isolado

Isto refere-se ao estado em que os membros de ligação da invenção, ou ácido nucleico que codifica tais membros de ligação, estarão geralmente de acordo com a presente invenção. Os membros isolados e ácido nucleico isolado

estarão isentos ou substancialmente isentos de material com o qual estão naturalmente associados, tais como outros polipéptidos ou ácidos nucleicos com os quais estão presentes no seu ambiente natural ou no ambiente em que são preparados (por exemplo, cultura de células) quando essa preparação é pela tecnologia de ADN recombinante praticada *in vitro* ou *in vivo*. Os membros e ácido nucleico podem ser formulados com diluentes ou adjuvantes e, mesmo assim, para fins práticos, estarem isolados - por exemplo, os membros serão normalmente misturados com gelatina ou outros veículos se utilizados para revestir placas microtítulo a serem utilizadas em imunoenaios, ou serão misturados com veículos ou diluentes farmacologicamente aceitáveis quando utilizados em diagnóstico ou terapia. Os membros de ligação podem ser glicosilados, quer naturalmente ou por sistemas de células eucarióticas heterólogas (por exemplo, células CHO ou NS0 (ECACC 85110503)), ou podem permanecer não glicosilados (por exemplo, se produzidos por expressão numa célula procariótica).

Breve Descrição dos Desenhos

Figura 1. Análise de pA_2 de dois anticorpos anti-GM-CSFR α no ensaio de proliferação de TF-1. A proliferação de células TF-1 foi induzida com concentrações crescentes de GM-CSF na presença de concentrações crescentes de duas IgG4 otimizadas, Anticorpo 6 (Figura 1A) e Anticorpo 1 (Figura 1B), respetivamente. Para os dados mostrados no gráfico 1A e gráfico 1B foi medida a incorporação de timidina tritiada e foi calculada a EC50 de GM-CSF a cada concentração de anticorpo. Para os dados mostrados no gráfico 1C e gráfico 1D, as relações de dose foram em seguida calculadas e analisadas por regressão de Schild a fim de obter os valores de pA_2 .

Figura 2. Análise de pA_2 de um anticorpo anti-GM-CSFR α , Anticorpo 6, nos ensaios de alteração de forma de granulócitos. Os granulócitos humanos (gráfico 2A e 2C) ou de cynomolgus (2B e 2D) foram tratados com concentrações crescentes de GM-CSF na presença de concentrações crescentes de IgG4. A alteração na forma dos granulócitos foi medida utilizando citometria de fluxo e foi calculada a EC50 de GM-CSF a cada concentração de anticorpo (gráfico 2A e gráfico 2B). As relações de dose foram em seguida calculadas e analisadas por regressão de Schild a fim de obter os valores de pA_2 (gráfico 2C e gráfico 2D).

Figura 3. Potência antagonista de dois anticorpos, Anticorpos 1 e 6, respectivamente, como IgG4s num ensaio que mede a proliferação de células TF-1 induzida por 7pM de GM-CSF humano. São também mostrados os dados para o controlo positivo IgG4 2B7 e para um controlo de isotipo IgG4. Os dados representam a média com barras de desvio padrão de determinações em triplicado na mesma experiência.

Figura 4. Potência antagonista de dois anticorpos, Anticorpos 1 e 6, respectivamente, como IgG4s num ensaio que mede a alteração de forma de granulócitos humanos induzida por 7pM de GM-CSF humano. São também mostrados os dados para o controlo IgG4 2B7 e para um controlo de isotipo IgG4. Os dados representam a média com barras de desvio padrão de determinações em triplicado na mesma experiência.

Figura 5. Potência antagonista de dois anticorpos, Anticorpos 1 e 6, respectivamente, como IgG4s num ensaio que mede a libertação de TNF α a partir de monócitos humanos estimulados com 1nM de GM-CSF humano. São também mostrados os dados para o anticorpo de controlo 2B7 e para um controlo de isotipo IgG4. Os dados representam a média com

barras de desvio padrão de determinações em triplicado na mesma experiência.

Figura 6. Potência antagonista de dois anticorpos, Anticorpos 1 e 6, respetivamente, como IgG4s num ensaio que mede a sobrevivência de granulócitos humanos induzida por 7pM de GM-CSF humano. São também mostrados os dados para o anticorpo de controlo 2B7 e para um controlo de isotipo IgG4. Os dados representam a média com barras de desvio padrão de determinações em triplicado na mesma experiência.

Figura 7. Os mAbs humanos amadurecidos por afinidade, Anticorpo 1 e Anticorpo 6, mas não o mAb humano parental 28G5 (Anticorpo 3) ou o anticorpo murídeo conhecido 2B7, inibem a diferenciação estimulada por GM-CSF de progenitores hematopoiéticos humanos. 5×10^4 células mononucleares descongeladas de uma amostra de aférese foram cultivadas em ágar semissólido na presença de 10 ng/mL de GM-CSF e a concentração indicada de mAb. As colónias foram contadas no dia 14. O gráfico mostra o número de colónias contra a concentração de mAb em $\mu\text{g/mL}$.

Figura 8. Análise dose-resposta da eficácia do mAb amadurecido por afinidade em ratos quiméricos Tg huGM-CSFR. Grupos de 5 ratos quiméricos Tg foram tratados com 500 ng de huGM-CSF (ou PBS) s.c. duas vezes por dia durante 4 dias (D.1-D.4) e com controlo (CAT001) ou mAb de ensaio (Anticorpo 6) às concentrações indicadas no D.0. Os pesos dos baços foram avaliados no D.5.

Figura 9. Análise dose-resposta da eficácia do Anticorpo 6 num ensaio de libertação de citocinas endógenas a partir de células mononucleares de sangue periférico humano. 1×10^6 células foram cultivadas durante 72 h na presença e

ausência de anticorpo e foi realizado um ELISA para a IL-6 e TNFa nos sobrenadantes. Os dados representam a inibição média com barras de desvio padrão de determinações em duplicado na mesma experiência.

Parte Experimental

Antecedentes

Os fragmentos de anticorpo humano podem ser selecionados *in vitro* a partir de reportórios apresentados na superfície de bacteriófagos filamentosos. Este processo é conhecido como apresentação em fago e proporciona um meio para obter fragmentos de anticorpo humano. O processo pode ser utilizado para isolar especificidades anti-humanas humanas e pode ser ajustado para obter anticorpos com características de afinidade particulares.

Os fragmentos de anticorpo consistindo apenas dos domínios variável da cadeia pesada (VH) e variável da cadeia leve (VL) ligados em conjunto por uma unidade de ligação peptídica curta contêm toda a informação que é necessária para determinar a ligação ao antígeno. Tais fragmentos são conhecidos como Fv de cadeia simples (scFv). Foi mostrado que, quando apresentados na superfície do fago, os scFv dobram-se corretamente e ligam-se ao antígeno. Reportórios grandes de scFv humano foram construídos deste modo e proporcionaram uma fonte, a partir da qual podem ser isolados clones individuais para desenvolvimento como candidatos a fármacos. Os scFv candidatos são em seguida reformatados como moléculas de IgG inteira (tipicamente IgG humana) para aplicações terapêuticas.

Sumário

Foram realizadas seleções numa biblioteca de apresentação de fagos de scFv obtida a partir de linfócitos de baço humano para enriquecer relativamente a populações de fagos que se ligam ao GM-CSFR α humano. Nós isolamos anticorpos de scFv possuindo características selecionadas e convertimos estes scFv em IgG₄. Utilizando uma variedade de ensaios, um painel de anticorpos foi isolado, otimizado e tratado com linha germinal para produzir IgG₄ com especificação apropriada para um anticorpo terapêutico.

Foram obtidos 19 clones de anticorpo, cujas sequências são mostradas como anticorpos 1, 2 e 4-20 na listagem de sequências, a partir de um anticorpo parental. O anticorpo parental é mostrado como anticorpo 3 na listagem de sequências e é também aqui referido como 28G5. Os 19 clones foram selecionados como exibindo propriedades particularmente boas numa gama de ensaios biológicos, como descrito na Parte Experimental, e foram designados com os números de anticorpos 1, 2 e 4 a 20.

Os bioensaios foram concebidos para espelhar a natureza inflamatória de doenças tais como a artrite reumatoide. Por exemplo, a alteração de forma dos neutrófilos necessária para o seu recrutamento para o sítio de ação, a libertação de fatores pró-inflamatórios por monócitos e o aumento da sobrevivência dos tipos de células inflamatórias em resposta a sinais particulares. Os anticorpos exibem atividade de neutralização potente nestes ensaios.

Os protocolos detalhados dos métodos de ensaio utilizados são proporcionados abaixo na secção intitulada "Materiais e Métodos de Ensaio".

Isolamento do líder de anticorpo

Foi utilizada uma biblioteca grande de anticorpos humanos de FV de cadeia simples (scFv) para as seleções. Esta foi obtida a partir de linfócitos do baço de 20 dadores saudáveis e clonada num vetor de fagomídeo. Os ScFv que reconheceram o GM-CSFR α foram isolados a partir da biblioteca de apresentação de fagos numa série de ciclos de seleção repetidos em GMCSF-R α purificado obtido a partir da sobreexpressão de um domínio extracelular, solúvel, marcado para purificação do recetor em células HEK293T. Isto foi conseguido essencialmente como descrito em Vaughan et al [102]. Em resumo, após exposição do recetor biotinilado à biblioteca de fagos, a proteína com o fago ligado foi capturada sobre esferas magnéticas revestidas com estreptavidina. Os fagos não ligados foram eliminados por lavagem. Os fagos ligados foram em seguida recuperados como descrito por Vaughan et al e o processo de seleção foi repetido. Foram realizados três ciclos de seleção a concentrações cada vez menores de antigénio. Uma proporção representativa dos scFvs resultantes dos ciclos de seleção foram submetidos a sequenciação de ADN.

Após estas seleções iniciais a partir da biblioteca de apresentação de fagos, foi identificado um painel de scFv únicos num ensaio de ligação a ligando, o qual foi concebido para identificar fagos que expressam anticorpos scFv que eram capazes de inibir a ligação de GM-CSF ao domínio extracelular de GM-CSFR α purificado. A potência de neutralização destes scFv no ensaio de ligação a ligando variou desde 0,65 a 3,3 nM.

Os anticorpos que foram ativos no ensaio bioquímico de ligação a ligando foram avaliados quanto à atividade biológica num ensaio de proliferação de TF-1, que mediu a potência de neutralização avaliando a aptidão dos anticorpos para inibir a proliferação de células TF-1

estimuladas com GM-CSF. A TF-1 é uma linha de células pré-mieloides humanas provenientes de um doente com eritroleucemia. Esta linha de células é dependente de fator para sobrevivência e proliferação e é rotineiramente mantida em GM-CSF humano. A inibição da proliferação dependente de GM-CSF foi determinada medindo a redução na incorporação de timidina tritiada no ADN sintetizado de novo de células em divisão. Todos os scFv tinham potência mensurável neste ensaio, com valores de IC50 que variam desde cerca de 180 a 1200 nM.

Os clones de scFv mais potentes foram reformatados como moléculas de anticorpo de IgG4 humana com um domínio constante da cadeia pesada gama 4 humana e um domínio constante da cadeia leve lambda humana. Foram construídos vetores para os clones de scFv mais potentes para permitir a expressão dos anticorpos como anticorpo de IgG4 inteiro como descrito por Persic et al. [100] com algumas modificações. Foi incluído um fragmento oriP nos vetores para facilitar a utilização com as células HEK-EBNA 293 e para permitir a replicação epissômica. O domínio variável VH foi clonado no poliligador entre a sequência líder de secreção e o domínio constante gama 4 humano do vetor de expressão pEU8.1(+). O domínio variável VL foi clonado no poliligador entre a sequência líder de secreção e o domínio constante lambda humano do vetor de expressão pEU4.1(-). As células HEK-EBNA 293 foram co-transfetadas com as construções que expressam a cadeia pesada e leve, e o anticorpo inteiro foi purificado do media condicionado utilizando cromatografia de afinidade de proteína A. As preparações de anticorpo purificadas foram esterilizadas por filtração e conservadas a 4°C em soro fisiológico tamponado com fosfato (PBS) antes da avaliação. A concentração de proteína foi determinada medindo a absorvância a 280nm utilizando o método BCA (Pierce).

As IgG reformatadas foram comparadas com o anticorpo murídeo conhecido 2B7 no ensaio de proliferação de TF-1. As IgG4s conservaram ou ganharam atividade neste ensaio, com valores de IC50 que variam desde 6 até cerca de 1600 nM.

Na doença inflamatória é necessária a alteração de forma dos neutrófilos para o seu recrutamento para o sítio de ação. Foi concebido um ensaio de alteração da forma de granulócitos humanos para imitar esta resposta biológica utilizando triagem celular ativada por fluorescência (FACS) para medir a alteração da forma dos granulócitos isolados do sangue após a sua exposição a GM-CSF. Foi avaliada a aptidão dos anticorpos de IgG4 anti-GM-CSFR α para inibir a resposta de alteração de forma dos neutrófilos ao GM-CSF, e os valores de IC50 de clones selecionados variou desde cerca de 15 a 350 nM. Um anticorpo representativo 28G5 neutralizou o GMCSF-R de cynomolgus no ensaio de alteração de forma granulócitos de cynomolgous com uma IC50 de cerca de 5 nM. O anticorpo murídeo conhecido 2B7 foi também capaz de neutralizar a resposta biológica resultante da ligação do GM-CSF ao recetor de cynomolgus.

A afinidade de ligação ao recetor dos anticorpos foi então medida utilizando BIAcore, com valores de K_D calculados a variar desde 32 a 377 nM.

Otimização

Num esforço para melhorar a potência do 28G5 foi iniciado um programa de otimização. Foram produzidas bibliotecas de anticorpos onde se realizou a mutagénese aleatória das CDR3s de VH ou VL. Cada CDR3 foi aleatorizada em dois blocos de 6 aminoácidos para cobrir toda a CDR, produzindo as bibliotecas H1 (bloco N-terminal de 6 aa da CDR3 de VH),

H2 (bloco C-terminal de 6 aa da CDR3 de VH), L1 (bloco N-terminal de 6 aa da CDR3 de VL) e L2 (bloco C-terminal de 6 aa da CDR3 de VL). As bibliotecas resultantes foram submetidas a ciclos de seleção repetidos quanto à ligação ao GM-CSFR α humano. Os clones isolados deste processo de seleção foram em seguida utilizados para construir uma biblioteca de fagos combinada que continha scFv com CDR3s da cadeia pesada mutadas e CDR3s da cadeia leve mutadas. Estas bibliotecas foram também submetidas ao mesmo procedimento de seleção.

Em cada fase do processo de otimização, as scFv que foram capazes de inibir a ligação da IgG4 de 28G5 ao recetor de GM-CSF foram identificadas utilizando um ensaio de competição de epítomos com o 28G5 e o recetor, e foram em seguida avaliadas no ensaio de proliferação de TF-1, como descrito abaixo.

Após mutagénese aleatória das sequências CDR3 da cadeia pesada de 28G5 foi identificado um painel de scFv com potência de neutralização mensurável no ensaio de TF-1. A maioria das melhorias de potência foram obtidas quando foi aleatorizada a extremidade 3' da CDR3 de VH.

Após mutagénese aleatória das sequências CDR3 da cadeia leve de 28G5, foi identificado um painel de scFv com potência de neutralização mensurável no ensaio de TF-1. Todas as melhorias de potência foram obtidas quando foi aleatorizada a extremidade 3' da CDR3 de VL.

Após combinação das bibliotecas de mutagénese aleatória da CDR3 da cadeia pesada e leve, foi identificado um painel de scFvs com potência melhorada no ensaio de proliferação de TF-1 relativamente ao scFv parental 28G5. Foram isoladas as ScFv com melhorias de potência >60000 vezes relativamente

ao 28G5 parental. Todas as combinações das bibliotecas resultaram em scFv melhorados, isto é H1/L1, H1/L2, H2/L1, H2/L2. Isto é particularmente interessante porque não foram isolados quaisquer scFvs melhorados a partir da biblioteca L1.

Um painel de 19 scFv identificados durante a otimização do 28G5 foi reformatado e expressado como IgG4s, utilizando os métodos descritos acima. O painel era constituído pelos clones de anticorpo 1, 2 e 4 a 20. Alguns dos clones mais potentes neste painel foram obtidos das bibliotecas mutadas de CDR3 de H e L combinadas. Os anticorpos de IgG4 neste painel foram avaliados quanto à sua atividade no ensaio de proliferação de TF-1 e foram comparados com o anticorpo murídeo conhecido 2B7. Todas as IgG4s otimizadas eram mais potentes do que o 2B7 neste ensaio. Nesta ocasião, o 2B7 tinha uma IC50 calculada de cerca de 1,6 nM, enquanto que os clones tinham valores de IC50 calculadas que variavam desde cerca de 1 pM até cerca de 1100 pM. Os dados são apresentados no Quadro 1 abaixo e resumidos como se segue:

IC50 <1500 pM	Anticorpos 1, 2 e 4 a 20
IC50 <300 pM	Anticorpos 1, 2, 4-12 e 14-20
IC50 <60 pM	Anticorpos 1, 2, 4-6, 8-11, 14 e 16-20
IC50 <10 pM	Anticorpos 1, 5, 6, 11 e 20.

A Figura 3 ilustra a potência antagonista de dois anticorpos representativos da invenção, Anticorpo 1 e Anticorpo 6, em comparação com o anticorpo conhecido 2B7 no ensaio de proliferação de TF-1.

O sistema BIAcore 2000 (Pharmacia Biosensor) foi utilizado para avaliar os parâmetros cinéticos da interação de algumas das IgG4s otimizadas para o líder com o domínio extracelular de recetor de GM-CSF marcado para purificação

recombinante. A afinidade dos anticorpos foi muito melhorada, com valores de K_D calculados desde 0,127 nM até cerca de 5 nM. Os dados são mostrados no Quadro 2. Foram obtidas melhorias tanto nas velocidades de ativação como nas velocidades de desativação. A correlação entre a afinidade das IgG4s para o domínio extracelular solúvel do GM-CSFR α e o seu desempenho no ensaio de TF-1 foi muito boa com um coeficiente de Pearson de 0,85 ($p < 0,0001$). A título de comparação, a K_D do 2B7 foi calculada separadamente e era de cerca de 7 nM.

Os anticorpos de IgG4 identificados durante a otimização do 28G5 foram avaliados no ensaio de alteração da forma de granulócitos humanos e foram comparados com o anticorpo murídeo conhecido 2B7. Todos os anticorpos que foram avaliados neste ensaio (anticorpos 1, 2, 5, 6, 9-11, 16 e 20) foram muito potentes com IC_{50} s que vão desde 7,8 a 90 pM. Destes, os anticorpos 1, 2, 5, 6, 9, 16 e 20 tinham IC_{50} s inferiores a 50 pM, e os anticorpos 1, 2, 6, 16 e 20 tinham IC_{50} s inferiores a 25 pM. Os nossos anticorpos foram mais potentes do que o 2B7, o qual tinha uma IC_{50} de 477pM. Os dados são mostrados no Quadro 3. A Figura 4 ilustra a potência antagonista de dois anticorpos representativos da invenção, Anticorpo 1 e Anticorpo 6, em comparação com o anticorpo conhecido 2B7 no ensaio de alteração da forma de granulócitos humanos.

Os anticorpos de IgG4 identificados durante a otimização do 28G5 foram avaliados no ensaio de alteração da forma de granulócitos de cynomolgus. Todos os anticorpos foram capazes de neutralizar a atividade do GM-CSF no recetor do cynomolgus bem como no recetor humano, e todos os anticorpos foram mais potentes do que o 2B7. O 2B7 tinha uma IC_{50} de 26 pM enquanto que anticorpos representativos

(Anticorpo 6, Anticorpo 1 e Anticorpo 2) do painel tinham valores de IC50 de 1,73, 2,03 e 3,2 pM, respetivamente.

Um painel das IgG4s identificadas durante a otimização do 28G5 foi avaliado quanto à sua potência de neutralização no ensaio de libertação de TNF α de monócitos. Este ensaio testa a aptidão para inibir a libertação do fator pró-inflamatório TNF α a partir de monócitos humanos quando estes são tratados com GM-CSF. Os anticorpos 1, 2, 5, 6, 9 e 10 foram testados e foram todos ativos neste ensaio e foram capazes de neutralizar completamente a ação do GM-CSF no seu recetor (IC50 que vão desde cerca de 43 a 139) enquanto que a uma concentração de 333nM o 2B7 só conseguiu 50% de inibição da libertação de TNF α induzida por GM-CSF, indicando que este anticorpo é apenas um inibidor parcial neste ensaio. A Figura 5 ilustra a potência antagonista de dois anticorpos representativos da invenção em comparação com o anticorpo conhecido 2B7 no ensaio de libertação de TNF α de monócitos. Os dados são mostrados no Quadro 4 e são resumidos como se segue:

<150 pM	Anticorpo nos 1, 2, 5, 6, 9 e 10
<110 pM	Anticorpo nos 1, 2, 5, 6 e 9
<100 pM	Anticorpo nos 1, 5, 6 e 9

Uma marca distintiva da doença inflamatória é o aumento da sobrevivência dos tipos de células inflamatórias em resposta a sinais particulares. Os granulócitos são capazes de sobreviver durante mais tempo na presença de GM-CSF e, deste modo, avaliou-se a aptidão dos anticorpos de IgG4 isolados durante a otimização do 28G5 para inibir esta resposta, num ensaio de sobrevivência de granulócitos. Todas as IgG4s anti-GM-CSFR α da otimização de líder foram ativas neste ensaio e as potências de neutralização (IC50) representativas variaram desde 7,0 a 843,7 pM. Isto

contrasta com o anticorpo murídeo conhecido 2B7 que foi completamente inativo até uma concentração de 83 nM. A Figura 6 ilustra a potência antagonista de dois anticorpos representativos da invenção, Anticorpo 1 e Anticorpo 6, em comparação com o anticorpo conhecido 2B7 no ensaio de sobrevivência de granulócitos.

Como ilustrado nas Figuras 3 a 6, estes dados indicam que os nossos anticorpos têm propriedades significativamente diferentes em comparação com o anticorpo murídeo conhecido 2B7. Por exemplo, os anticorpos representativos da invenção inibiram a sobrevivência de granulócitos e a proliferação de TF-1 estimulada com 7 pM de GM-CSF nos ensaios de sobrevivência de granulócitos e proliferação de TF-1 respectivamente, enquanto que o 2B7 não inibiu a sobrevivência de granulócitos mas inibiu a proliferação de TF-1 (se bem que em menor grau do que os nossos anticorpos). Os dados indicam que os membros de ligação da invenção têm maior afinidade e melhor aptidão para inibir uma variedade de efeitos biológicos mediados através do GM-CSF-R em comparação com anticorpos anti-GM-CSFR α conhecidos.

As sequências de aminoácidos derivada de 28G5 e dos seus derivados foram alinhadas com as sequências conhecidas da linha germinal humana na base de dados VBASE e a linha germinal mais próxima identificada pela semelhança de sequência. A linha germinal mais próxima para o domínio VH de 28G5 e seus derivados foi identificado como VH1 DP5. A VH do 28G5 tem 14 alterações relativamente à linha germinal V_H 1-24 (DP5) em regiões estruturais. A linha germinal mais próxima para o domínio VL é a V λ 1 VL 1-e (DPL8), que tem apenas 5 alterações relativamente à linha germinal nas regiões estruturais. As regiões estruturais do 28G5 e seus derivados foram restituídos à linha germinal por mutagênese

específica de um locus para condizer identicamente com anticorpos humanos nativos. Todos, à exceção de um aminoácido, poderiam ser convertidos na linha germinal apenas com alterações modestas na potência do anticorpo. O aminoácido isoleucina na posição 94 da cadeia pesada (utilizando a numeração de Kabat, Kabat et al. 1971) não podia ser modificado para a treonina da linha germinal sem uma perda total de atividade. Por conseguinte, esta única alteração relativamente à linha germinal foi mantida na região estrutural do anticorpo.

Foi realizada uma análise pA_2 completa de dois dos anticorpos anti-GM-CSFR α , Anticorpo 6 e Anticorpo 1, no ensaio de proliferação de TF-1. Os dados confirmam que estes anticorpos são antagonistas altamente potentes neste sistema com valores de pA_2 calculados de $-11,3 \pm 0,2$ e $-11,0 \pm 0,2$, respetivamente (Figura 1).

Foi realizada uma análise pA_2 completa de um dos anticorpos anti-GM-CSFR α , Anticorpo 6, nos ensaios de alteração de forma de granulócitos humanos e de cynomolgus. Os dados confirmam que este anticorpo é um antagonista altamente potente nestes sistemas com valores de pA_2 calculados de $-10,58$ e $-10,78$ nos ensaios humano e de cynomolgus, respetivamente (Figura 2).

O GM-CSF estimula a diferenciação de células progenitoras hematopoiéticas em colónias de granulócitos e macrófagos em ensaios em ágar semissólido. Por conseguinte, o Anticorpo 6 e Anticorpo 1 amadurecidos por afinidade, o mAb parental Anticorpo 3 (28G5) e um controlo negativo (CAT001) foram avaliados quanto à sua aptidão para antagonizar esta atividade específica do GM-CSF utilizando células progenitoras derivadas de sangue periférico, num ensaio de formação de colónias. Os dados apresentados na Figura 7

demonstram que ambos os mAbs representativos amadurecidos por afinidade foram inibidores potentes da formação de colónias hematopoiéticas *in vitro* mediada pelo GM-CSF humano.

Os valores de IC₅₀ aproximados foram 0,08 µg/mL (Anticorpo 6) e 0,25 µg/mL (Anticorpo 1) para o mAb amadurecido por afinidade. Curiosamente, o anticorpo murídeo conhecido 2B7 pareceu ter pouca, se é que alguma, atividade inibidora neste ensaio até uma concentração de 66nM.

Em experiências de controlo, o mAb amadurecido por afinidade não tinha qualquer efeito na formação de colónias mediada pela combinação de SCF + IL-3 + G-CSF como esperado e, na ausência de citocinas, a formação de colónias foi insignificante (<4 colónias / cultura).

Para a análise *in vivo* da atividade antagonista do mAb específico para huGM-CSFR α , pode ser utilizado o transplante de medula óssea de ratos transgênicos (Tg) que expressam ambas as cadeias α e β do GM-CSFR humano em ratos de tipo selvagem para gerar animais quiméricos em que a expressão de huGM-CSFR transgênico esteja limitada às células hematopoiéticas derivadas da medula óssea e, deste modo, se assemelhe mais de perto com o perfil de expressão do recetor endógeno. Nestes ratos quiméricos Tg a administração de huGM-CSF leva a um aumento do peso do baço e à marginalização dos monócitos sanguíneos circulantes. O Anticorpo 6 amadurecido por afinidade e um mAb de controlo negativo, CAT001, foram avaliados quanto à sua aptidão para antagonizar estas respostas *in vivo* mediadas por GM-CSF. Para a análise dose-resposta, 6 grupos de 5 ratos quiméricos Tg foram tratados com 500 ng de huGM-CSF s.c. duas vezes por dia durante 4 dias (dia 1-4) e um sétimo grupo de controlo de cinco animais recebeu apenas PBS.

Quatro dos 6 grupos de animais tratados com huGM-CSF receberam mAb de ensaio (Anticorpo 6) a 16 mg/kg, 5,3 mg/kg, 1,78 mg/kg ou 0,59 mg/kg no D.0 enquanto que um quinto grupo dos animais tratados com huGM-CSF recebeu o controlo CAT001 a 16 mg/kg no D.0. Os resultados apresentados na Figura 8 demonstram que, em comparação com o controlo de PBS, o tratamento com huGM-CSF induziu um aumento significativo no peso do baço e uma diminuição dos monócitos sanguíneos circulantes. Como esperado, o tratamento com 16 mg/kg do controlo CAT001 não teve qualquer efeito sobre o aumento de peso do baço ou sobre a diminuição dos monócitos sanguíneos. Em contraste, houve um efeito dose-resposta claro após tratamento com o mAb de ensaio Anticorpo 6, já que a 16 mg/kg este anticorpo anulou o aumento de peso do baço e, embora ainda evidente, o efeito foi fortemente reduzido a 0,59 mg/kg de mAb. A IC_{50} parecia situar-se algures entre 0,59 mg/kg e 1,78 mg/kg. Um resultado semelhante foi observado para a diminuição induzida por GM-CSF nos monócitos circulantes - o tratamento com o mAb de ensaio Anticorpo 6 a 16 mg/kg anulou a diminuição, enquanto o mAb a 0,59 mg/kg teve apenas um impacto menor nesta resposta. Estes dados mostram que o anticorpo anti-GM-CSFR α é um antagonista de GM-CSFR α humano *in vivo*.

A fim de investigar adicionalmente as propriedades anti-inflamatórias destes anticorpos anti-GM-CSFR α , o Anticorpo 6 foi avaliado numa ensaio de libertação de citocinas de células mononucleares do sangue periférico. Neste ensaio, o TNF α e a IL-6 podem ser libertados endogenamente, dependendo do dador. Neste ensaio, o GM-CSF também é produzido endogenamente pelas células, ao invés de adicionado exogenamente, e, por conseguinte, os resultados observados neste ensaio representam a inibição dos efeitos

biológicos da ligação do GM-CSF endógeno nativo ao seu recetor.

Após administração do anticorpo 6, ambas estas citocinas foram inibidas de forma dependente com a dose, como ilustrado na figura 9. Estes dados indicam que estes anticorpos podem inibir a atividade de GM-CSF nativo e que ao inibir a sinalização de GM-CSF é possível inibir citocinas pró-inflamatórias chave, tais como IL-6 e TNF α , as quais estão ambas implicadas num número de indicações inflamatórias tais como a artrite reumatoide.

Além disso, com base neste resultado com o Anticorpo 6 pode esperar-se que cada um dos anticorpos 1 a 20 também poderia demonstrar inibição neste ensaio, uma vez que se acredita que todos os anticorpos 1 a 20 se ligam à mesma região do GM-CSFR α .

Mapeamento de Resíduos Importantes para o Reconhecimento do Antígeno, e Análise da Sequência

Nós determinamos a variabilidade de resíduos em posições da sequência do scFv do Anticorpo 6 tratado com linha germinal para identificar quais as posições que são normalmente conservadas para ligação a ligando e quais as posições que são variáveis num anticorpo que conserva ainda atividade de ligação a ligando.

As posições que contribuem para a ligação ao antígeno parecem ser os resíduos Kabat 27A, 27B, 27C, 32, 51, 52, 53, 90, 92 e 96 no domínio VL e os resíduos Kabat 17, 34, 54, 57, 95, 97, 99 e 100B no domínio VH.

Foram identificadas sete posições que pareceram ser importantes para ligação ao antígeno: H95, H97, H99,

H100B, L90, L92 e L96. Nós analisamos em seguida os resíduos nestas posições em sequências de 160 variantes isoladas durante o processo de otimização do anticorpo 28G5, as quais exibiram todas uma melhoria mínima de 5 vezes na potência no ensaio de proliferação de TF-1.

Os dados no Quadro 5 abaixo resumem os diferentes aminoácidos (dos 20 possíveis) que foram observados em cada uma destas posições e em L95A. Quando as posições são fortemente conservadas em relação aos aminoácidos presentes no 28G5 e/ou Anticorpo 6, isto é uma boa evidência de que aqueles aminoácidos são chave para ligar o antigénio. Por exemplo, os resíduos nas seguintes posições são fortemente conservados: H97, H100B, L90, L92.

Método

A sequência de ADN que codifica o scFv do Anticorpo 6 tratado com linha germinal e amadurecido por afinidade foi convertida no formato de apresentação de ribossoma, essencialmente como descrito na ref. [101]. Foi realizada PCR propensa a erro na sequência do Anticorpo 6, utilizando as condições de alta mutação (7,2 mutações per 1 000 bp) do protocolo do fabricante (BD Bioscience), para criar uma biblioteca de sequências 574D04 variantes contendo mutações pontuais aleatórias. Esta biblioteca foi expressada em ribossomas e incubada com GM-CSFR α marcado para purificação para permitir a ocorrência de ligação. As variantes capazes de se ligarem ao GM-CSFR α marcado foram capturadas e removidas utilizando esferas paramagnéticas revestidas com proteína G (Dyna). As variantes não ligadas que permaneceram na população foram adicionadas a uma mistura de quatro anticorpos anti-idiotípicos biotinilados, os quais tinham sido previamente obtidos a partir da grande biblioteca de apresentação de fagos de anticorpos humanos

descrita na ref. [102] e que se sabia que se ligavam ao scFv do Anticorpo 6. As variantes ligadas pelos anticorpos anti-idiotípicos biotinilados foram capturadas com esferas de estreptavidina, enquanto que as variantes não ligadas foram eliminadas por lavagem. Este processo foi repetido durante mais dois ciclos de seleção de apresentação de ribossoma, seguindo a metodologia geral da ref. [101].

Uma proporção representativa das variantes resultantes da seleção foi clonada num vetor de fagomídeo e as variantes de scFv foram expressadas em fago para avaliação por ELISA, utilizando o mesmo método como descrito em Edwards BM et al (2003) Journal of Molecular Biology Vol 334:103. Aquelas variantes que não exibiram ligação ao GM-CSFR α marcado para purificação foram avaliadas quanto à ligação à mistura de quatro anticorpos anti-idiotípicos que foram utilizados na seleção. As variantes que, no ensaio de ligação anti-idiótipo, demonstraram ligação que era igual ou superior à do scFv do Anticorpo 6 foram sequenciadas e as sequências foram analisadas para encontrar posições em que havia uma alta frequência de mutação.

Constatou-se que a taxa de mutação média da população de variantes era de 3,05 aminoácidos por cadeia V_H ou V_L , utilizando 486 sequências para as cadeias V_H e 451 sequências para as cadeias V_L . Elas foram analisadas quanto à presença de pontos quentes mutacionais, representando graficamente a frequência de mutação em relação à sua posição ao longo do scFv. A análise centrou-se naqueles clones com pelo menos uma mutação na CDR por V_H e V_L e menos de 4 mutações por V_H e V_L . A partir deste painel de 123 sequências V_H e 148 sequências V_L , os pontos quentes foram definidos como aqueles que tinham uma frequência mutacional de 5% ou mais.

Destacaram-se sete posições nas V_H CDR3 e V_L CDR3 do Anticorpo 6 como posições putativas importantes para ligação ao antigénio utilizando o método de seleção negativa de apresentação de ribossoma. Foi então realizada uma análise sobre 160 variantes de sequência isoladas durante o processo de otimização do anticorpo 28G5, na qual as sequências inteiras das V_H CDR3 e V_L CDR3 foram aleatorizadas e selecionadas relativamente a uma maior afinidade. Todas as sequências (incluindo o Anticorpo 6) são variantes de 28G5 que exibiram uma melhoria mínima de 5 vezes em termos de potência no ensaio de proliferação de TF-1.

Determinação do Epítopo Linear

Nós rastreamos o Anticorpo 6 e o anticorpo conhecido 2B7 contra 2442 péptidos, representando cada um regiões curtas da sequência de aminoácidos da porção extracelular do GM-CSFR- α , utilizando um método PEPSCAN. Foi determinada a média dos sinais de ligação para cada anticorpo contra todos os péptidos para gerar um sinal de fundo médio e para cada péptido foi calculada uma razão sinal / ruído. Para ambos, Anticorpo 6 e 2B7, uma razão sinal / ruído de quatro ou mais foi contado como um sinal positivo específico. As sequências de péptidos que originaram um sinal positivo específico foram analisadas quanto à presença de motivos de ligação conservados e verificou-se que o Anticorpo 6 se ligava preferencialmente a um motivo YLDFQ, que corresponde aos resíduos 226 a 230 do GM-CSFR α humano maduro, e o anticorpo 2B7 ligava-se preferencialmente a um motivo DVRI, que corresponde aos resíduos 278 a 281 do GM-CSFR α humano maduro. A numeração da sequência de aminoácidos para o recetor maduro é como indicada na SEQ ID NO: 206.

Método PEPSCAN (varrimento de ligação de péptidos)

Foram sintetizados péptidos sintéticos 15-meros na maioria sobrepostos possuindo sequências derivadas de GMCSF e rastreados utilizando cartões mini-PEPSCAN em formato de cartão de crédito (placa de 455 poços com poços de 3 uL) como anteriormente descrito [103]. A ligação de anticorpos a cada péptido foi testada num imunoensaio ligado a enzima (ELISA) baseado em PEPSCAN. Os cartões de polipropileno em formato de cartão de crédito de 455 poços contendo os péptidos covalentemente ligados foram incubados com amostra (por exemplo 10 ug/mL de anticorpo ou soro diluído a 1/1000 numa solução de PBS que contém 5% de soro de cavalo (v/v) e 5% de ovalbumina (p/v)) e 1% de Tween80 ou no caso de bloqueio suave numa solução de PBS com 4% de soro de cavalo (v/v) e 1% de Tween80 (4°C, de um dia para o outro). Depois de lavar, os péptidos foram incubados com uma peroxidase anti-anticorpo (diluição a 1/1000, por exemplo peroxidase anti-rato de coelho, Dako) (1 h, 25°C) e, subsequentemente, depois de lavar, foram adicionados o substrato de peroxidase sulfonato de 2,2'-azino-di-3-etilbenzotiazolina (ABTS) e 2 uL/mL de H₂O₂ a 3%. Após 1 h, mediu-se o desenvolvimento de cor. O desenvolvimento de cor do ELISA foi quantificado com uma câmara CCD e um sistema de processamento de imagem. A montagem consiste de uma câmara CCD e uma lente de 55 mm (Sony CCD Video Camara XC-77RR, Nikon micro-nikkor, lente de 55 mm f/2,8), um adaptador de câmara (Sony Camara adaptor DC-77RR) e o pacote de Software de Processamento de Imagem Optimas, versão 6.5 (Media Cybernetics, Silver Spring, MD 20910, E.U.A.). O Optimas corre num sistema computador pentium.

Materiais e Métodos de Ensaio

Ensaio bioquímico de ligação a ligando

Foram preparadas preparações de scFv purificado como descrito no Exemplo 3 da W001/66754 [104]. As concentrações de proteína das preparações de scFv purificado foram determinadas utilizando o método BCA [105]. Placas microtítulo de 96 poços Fluoronunc[™] foram revestidas de um dia para o outro a 4°C com 50µL/poço de IgG4 anti-humana diluída a 2,5µg/mL em PBS. As placas foram lavadas 3 vezes com 300µL/poço de PBS/0,1% de Tween-20, antes de serem bloqueadas durante 1 hora à temperatura ambiente com 300µL/poço de 3% de BSA em PBS. As placas foram novamente lavadas 3 vezes com 300µL/poço de PBS/0,1% de Tween-20 e em seguida foram adicionados 50µL de GM-CSFR α humano diluído a 62,5ng/mL em 1% de BSA/PBS a cada poço e as placas foram incubadas durante 1 hora à temperatura ambiente. Depois de lavar 3 vezes como descrito acima, foram adicionados 25µL de material de amostra a cada poço, seguidos de 25µL de GM-CSF biotinilado diluído a 2nM em 1% de BSA/PBS. Para definir a ligação total foi utilizado apenas tampão como o material de amostra. Para definir a ligação não específica foi utilizado GM-CSF não marcado diluído a 100nM em 1% de BSA como o material de amostra. As placas foram incubadas durante 1 hora à temperatura ambiente, antes de se lavar 3 vezes como descrito acima. Foram adicionados 50 µL de estreptavidina marcada com európio (PerkinElmer) diluída a 100ng/mL em tampão de ensaio DELFIA[™] a cada poço da placa e foi incubada durante 30-60 minutos à temperatura ambiente, antes de se lavar 7 vezes com tampão de lavagem DELFIA[™]. Foram adicionados 50µL/poço de solução de otimização DELFIA[™] às placas e as amostras foram lidas a 615nm num leitor de placas.

Ensaio de proliferação de TF-1

Células TF-1, obtidas de R&D Systems e conservadas rotineiramente em RPMI 1640, 10% de FBS, piruvato de sódio

1mM e 4ng/mL de GM-CSF, foram privadas de nutriente lavando 3 vezes em meio de ensaio (RPMI 1640, 5% de FBS, piruvato de sódio 1mM), ressuspensando em ensaio meio e incubando durante 7-24 horas a 37°C em 5% de CO₂. As células foram em seguida ressuspensas a 1×10⁵/mL em meio de ensaio e foram adicionados 100 µL a cada poço de uma placa de cultura de tecidos de fundo plano de 96 poços. As amostras de ensaio foram preparadas por filtração estéril da amostra-mãe antes da diluição em meio de ensaio. Foram então adicionados 50µL de material de ensaio a cada poço de células e estas foram incubadas durante 45-60 min a 37°C em 5% de CO₂. Foram então adicionados 50µL de GM-CSF diluído ao valor de EC₈₀ em meio de ensaio (ou 0,4ng/mL para alguns lotes de GM-CSF) a cada poço e as placas foram incubadas durante 16 horas a 37°C em 5% de CO₂ numa câmara humidificada. Isto representa uma concentração final de 7 pM de GM-CSF. A fim de medir a proliferação das células, foram adicionados 20µL de ³H-timidina diluída a 5,0µCi/mL em meio de ensaio a cada poço da placa e as placas foram incubadas durante 4 horas ± 30 min a 37°C em 5% de CO₂. As células foram em seguida colhidas em placas GF/C Unifilter™ de 96 poços utilizando um coletor de placas e lavadas. Depois de adicionar 50µL de MicroScint 20™ a cada poço da placa de filtração, as placas foram seladas e contadas num leitor de placas TopCount.

Ensaio de alteração da forma de granulócitos humanos

Camadas leucocitárias humanas (bolsa de sangue humano do Serviço de Transfusão de Sangue) foram misturadas num volume igual de 3% de Dextrano T-500 em NaCl a 0,9%. A mistura foi então incubada numa posição vertical até se formar uma interface. A camada superior foi colhida e aplicada sobre um gradiente de densidade histopaque 1.077, o qual foi em seguida centrifugado a 400g durante 40

minutos e deixado parar sem travar. As camadas superiores deste gradiente foram removidas deixando o sedimento de granulócitos. Quaisquer glóbulos vermelhos remanescentes no sedimento foram submetidos a lise ressuspensando as células em 20 mL de água gelada durante 30s, seguida de adição imediata de cloreto de sódio a 1,8% gelado. As células foram em seguida re-sedimentadas a 1200rpm e ressuspensas em meio de ensaio (RPMI1640, 10% de FBS, 100u/mL de Penicilina, 100µg/mL de estreptomicina, HEPES 25 mM) a 1×10^6 /mL. Foram então adicionados 100µL de células a cada poço de uma placa de cultura de tecidos de fundo plano de 96 poços. As amostras de ensaio foram preparadas por filtração estéril das amostras-mãe e diluição, consoante apropriado, em meio de ensaio.

Para isolamento do líder, foram então adicionados 50µL de amostra de ensaio às células e as placas foram incubadas durante 45-60 min a 37°C em 5% de CO₂. Isto representa uma concentração final de 7 pM de GM-CSF. Isto foi seguido da adição de 50µL de GM-CSF diluído a 0,4ng/mL em meio de ensaio a cada poço e de uma incubação de 4 horas a 37°C em 5% de CO₂ numa câmara humidificada.

Para otimização do líder, as IgG4s filtradas diluídas em meio de ensaio foram misturadas com um volume igual de GM-CSF a 0,4ng/mL em meio de ensaio. Isto representa uma concentração final de 7 pM de GM-CSF. Foram então adicionados 100µL da mistura anticorpo/GM-CSF a cada poço. Isto foi seguido de uma incubação de 3 horas a 37°C em 5% de CO₂ numa câmara humidificada.

Foi adicionado formaldeído frio a uma concentração final de 1,25% e as células foram fixadas de um dia para o outro a 4°C. Foram analisados 2000-5000 eventos por poço por

citometria de fluxo. A média geométrica da dispersão direta (FSC) para cada amostra foi então obtida utilizando CellQuest. As células foram controladas para excluir populações irrelevantes (por exemplo células mortas/detritos) quando se calcula a média geométrica.

Ensaio de alteração da forma de granulócitos de cynomolgus

Os anticorpos foram avaliados num ensaio que mede a alteração da forma de granulócitos de cynomolgus após estimulação com GM-CSF. O granulócitos foram purificados de sangue completo de cynomolgus e o ensaio foi realizado essencialmente como descrito para o ensaio de alteração da forma de granulócitos humanos.

Dados de afinidade de ligação utilizando análise em biossensor

O sistema BIAcore 2000 (Pharmacia Biosensor) foi utilizado para avaliar os parâmetros cinéticos da interação entre scFvs e IgG4s com os recetores recombinantes. O Biossensor utiliza os efeitos óticos da ressonância plasmónica superficial para estudar alterações na concentração superficial resultantes da interação de uma molécula de analito com uma molécula de ligando que está ligada covalentemente a uma matriz de dextrano. Tipicamente, a espécie do analito em solução livre é feita passar sobre o ligando acoplado e qualquer ligação é detetada como um aumento no sinal de SPR local. Isto é seguido de um período de lavagem, durante o qual a dissociação da espécie do analito é observada como uma diminuição no sinal de SPR, após o que qualquer analito remanescente é retirado do ligando e o procedimento repetido a várias concentrações diferentes de analito. É geralmente utilizada uma série de controlos durante uma experiência para garantir que nem a

capacidade de ligação absoluta nem o perfil cinético do ligando acoplado se alteram significativamente. Um soro fisiológico tamponado com hepes patentado (HBS-EP) é tipicamente utilizado como o diluente principal das amostras de analito e o solvente da fase de dissociação. Os dados experimentais são registados em unidades de ressonância (correspondendo diretamente ao sinal de SPR) em relação ao tempo. As unidades de ressonância são diretamente proporcionais ao tamanho e quantidade de analito ligado. O pacote de software BIAevaluation pode ser depois utilizado para atribuir constantes de velocidade à fase de dissociação (unidades da velocidade de dissociação s^{-1}) e fase de associação (unidades da velocidade de associação $M^{-1} s^{-1}$). Estes valores permitem, em seguida, calcular as Constantes de Afinidade de Associação e Dissociação.

A afinidade da IgG4 foi estimada utilizando um único ensaio em que a IgG4 foi capturada não covalentemente pela superfície amina da proteína A. Uma série de diluições do domínio extracelular do recetor de GM-CSF marcado para purificação recombinante, desde 100 a 6,25nM, foi em seguida feita passar sequencialmente sobre a IgG4. A molaridade do recetor foi calculada utilizando a concentração (Bradford) e a massa prevista para o polipéptido maduro não modificado após a tradução (39,7 kDa). Cada um dos dois conjuntos de dados separados foi analisado em formatos idênticos. Os dados corrigidos em relação à célula de referência foram submetidos a ajuste utilizando o modelo de Langmuir 1:1 ajustado para cálculo global simultâneo das velocidades de associação e dissociação, com o valor de R_{max} ajustado para global. O nível de IgG4 capturada durante cada ciclo foi avaliado para assegurar que a quantidade capturada permanecia estável durante toda a experiência. Adicionalmente, a velocidade de dissociação da IgG4 foi avaliada para

determinar se era necessária uma correção para a deriva da linha de base. No entanto, ambas as interações da proteína A provaram ser suficientemente reprodutíveis e estáveis. A validade dos dados foi restringida pelos valores de χ^2 e T calculados (valor/desvio do parâmetro), os quais tinham de ser <2 e >100 , respetivamente.

Produção do domínio extracelular de GM-CSFR α marcado para purificação: Foi utilizado um vetor de expressão pEFBOS [106] que incorpora uma sequência que codifica o domínio extracelular do recetor de GM-CSF α humano (SEQ ID NO: 205, que representa os aminoácidos 1 a 298 do GM-CSFR maduro) com uma sequência sinal de IL-3 de murídeo e que incorpora uma etiqueta de purificação N-terminal para produzir o polipéptido do domínio extracelular (ECD) do recetor de GM-CSF marcado na extremidade N-terminal recombinante. O polipéptido de ECD marcado foi expressado nas células CHO utilizando o vetor pEFBOS utilizando procedimentos correntes. Este polipéptido também pode ser referido como domínio extracelular de GM-CSFR α purificado ou como o domínio extracelular solúvel de GM-CSFR α .

Pode ser utilizada qualquer etiqueta de purificação adequada, por exemplo, péptido Flag (DYKDDDE - SEQ ID NO: 204), Fc, biotina ou etiqueta de his. A purificação pode ser realizada utilizando qualquer técnica apropriada, por exemplo um polipéptido de ECD marcado com Flag (SEQ ID NO: 203) pode ser purificado numa coluna de cromatografia de afinidade M2 e eluído com o péptido FLAG.

Ensaio de libertação de TNF α de monócitos

Purificação de Monócitos (Kit de Isolamento de Monócitos - Miltenyi Biotec - 130-053-301):

Camadas leucocitárias humanas (bolsas de sangue humano do Serviço de Transfusão de Sangue) foram aplicadas sobre um gradiente de densidade histopaque 1.077 (Sigma, N° cat. 1077-1) e as células foram centrifugadas a 400×g durante 40 minutos. Não foi aplicada qualquer travagem quando se parava a centrifugadora. As células PBMC foram em seguida colhidas da interface. As células foram lavadas em PBS e sedimentadas a 300×g durante 10 min, antes dos glóbulos vermelhos remanescentes serem submetidos a lise ressuspensando em 20mL de água gelada durante 15s, seguida da adição imediata de NaCl a 1,8% gelado. As células foram em seguida sedimentadas a 1200rpm durante 5 min e ressuspensas em 600µL de tampão MACS (PBS, EDTA 2mM). Foram adicionados 200µL do reagente de bloqueio de Fc proporcionado com o kit às células e misturados, antes da adição de 200µL de cocktail de Hapteno-anticorpo (também proporcionou com o kit) e mistura. As células foram em seguida incubadas a 4°C durante 15 min, antes de lavar duas vezes em 50mL de tampão de MACS. O sedimento celular foi ressuspenso em 600µL de tampão de MACS, antes da adição de 200µL de reagente de bloqueio de Fc e mistura, seguidos de 200µL de microesferas anti-hapteno MACS e mistura. As células foram incubadas durante 45 min a 4°C, antes de lavar em 50mL de tampão de MACS e ressuspender em 500µL de tampão de MACS. Foi preparada uma única coluna (Miltenyi Biotec 130-042-401) lavando com 3mL de tampão de MACS antes da suspensão celular ter sido aplicada à coluna. O efluente foi recolhido como a fração de monócitos enriquecida. A coluna foi lavada com 2×3mL de tampão de MACS e o efluente foi recolhido. A pureza dos monócitos foi verificada por revelação com anti-CD14-PE utilizando métodos correntes de citometria de fluxo. As células foram finalmente ressuspensas a 4×10^6 /mL em meio de ensaio (RPMI 1640, 10% de FCS, 100U/mL de penicilina, 100µg/mL de estreptomicina).

Estimulação de Monócitos:

Foram adicionados 50 μ L de células a cada poço de uma placa de cultura de tecidos de fundo plano de 96 poços Costar. Foram adicionados 25 μ L de 150 μ g/mL de rhIFN γ (R&D Systems) a todos os poços. As IgG4s filtradas diluídas em meio de ensaio foram misturadas com um volume igual de GM-CSF a 56ng/mL (4nM) em meio de ensaio. Isto representa uma concentração final de 1 nM de GM-CSF. Foram então adicionados 75 μ L de mistura de anticorpo/GM-CSF a cada poço. Os controlos foram poços apenas com GM-CSF ou sem GM-CSF e sem anticorpo. As placas foram em seguida incubadas durante 18 horas a 37°C com 5% de CO₂ num câmara humidificada. O sobrenadante foi então colhido para ser testado quanto ao níveis de TNF- α por ELISA.

ELISA para TNF α (R&D Systems Sistema de Desenvolvimento de ELISA DY210): Placas de ELISA Immunosorb Fluoronunc foram revestidas de um dia para o outro à temperatura ambiente com 100 μ L de anticorpo de captura a 4 μ g/mL em PBS. As placas foram em seguida lavadas três vezes com PBS/0,1% de Tween e bloqueadas com 300 μ L/poço de 3% de Marvel em PBS durante 1 hora à temperatura ambiente. As placas foram lavadas 3 vezes com PBS/0,1% de Tween. Foram transferidos 100 μ L do sobrenadante das placas de ensaio para a placa de ELISA e foi adicionada uma titulação de TNF- α diluído em meio de ensaio aos poços de controlo. As placas foram incubadas à temperatura ambiente durante 2 horas, antes de serem lavadas 4-5 vezes com PBS/0,1% de Tween. Foram adicionados 100 μ L de anticorpo de deteção diluída a 300 ng/mL em 1% de Marvel/PBS a cada poço da placa e as placas foram incubadas durante mais 2 horas à temperatura ambiente, antes de serem lavadas 4-5 vezes com PBS/0,1% de Tween. Estreptavidina-Európio (PerkinElmer 1244-360) foi

diluída a 1:1000 em tampão de ensaio DELFIA (PerkinElmer 4002-0010) e adicionada a 100µL/poço antes da incubação durante 45min à temperatura ambiente. As placas foram em seguida lavadas 7 vezes em tampão de lavagem DELFIA, antes da adição de 100µL/poço de solução de otimização (PerkinElmer 4001-0010) e leitura a 615nm num leitor de placas.

Ensaio de sobrevivência de granulócitos

As células foram purificadas de camadas leucocitárias humanas como descrito para o ensaio de ativação de neutrófilos (ensaio de alteração de forma), lavadas em meio de ensaio (RPMI-1640 Glutamax, 10% de FBS, 100U/mL de Penicilina, 100µg/mL de estreptomicina) e ressuspensas a 1×10^6 /mL em meio de ensaio. Foram adicionados 100µL de células a cada poço de uma placa de cultura de tecidos de fundo plano de 96 poços Costar. Os lotes filtrados de anticorpo foram diluídos em meio de ensaio e misturados com um volume igual de GM-CSF a 0,4ng/mL. Isto representa uma concentração final de 7 pM de GM-CSF. Os poços de controlo continham apenas meio ou GM-CSF sozinho. Foram então adicionados 100µL da mistura amostra de ensaio/GM-CSF a cada poço numa placa e as células foram incubadas durante 68 horas a 37°C/5% de CO₂ numa câmara humidificada. Foram adicionados 20µL de AlamarBlue a cada poço e as placas foram incubadas durante mais 24 horas a 37°C/5% de CO₂ numa câmara humidificada. As placas foram em seguida lidas a 560nm e 590nm num leitor de placas.

Análise pA₂ de anticorpos anti-GM-CSFRα no ensaio de proliferação de TF-1 e nos ensaios de alteração da forma de granulócitos humanos e de cynomolgus

A principal ferramenta farmacológica para quantificar a afinidade de um antagonista competitivo é a análise de Schild. Utilizando esta abordagem pode ser determinado um meio independente do sistema para estimar a afinidade antagonista num ensaio funcional. O método baseia-se no conceito de que a concentração do antagonista e a sua afinidade determina o antagonismo da resposta agonista. Uma vez que o antagonismo pode ser quantificado e a concentração do antagonista é conhecida pode determinar-se a afinidade do antagonista. Este antagonismo é quantificado medindo a razão de concentrações igualmente ativas de agonistas, medidas na presença e ausência do antagonista, e referido como relações de dose (DR).

As relações de dose podem ser calculadas determinando a razão da EC50 do agonista (tipicamente GM-CSF) na ausência do membro de ligação relativamente à EC50 do agonista na presença de uma única concentração do membro de ligação. As relações de dose, expressas como $\log(DR-1)$, podem ser depois utilizadas numa regressão linear do \log [membro de ligação] para produzir uma regressão de Schild. Assim, para cada concentração do membro de ligação haverá um valor de DR correspondente; estes são representados graficamente como a regressão de $\log(DR-1)$ em função do \log [membro de ligação]. Se o antagonismo é competitivo, haverá uma relação linear entre o $\log (DR-1)$ e o \log [membro de ligação] de acordo com a equação de Schild em que a equação é como se segue

$$\text{Log}(DR-1) = \log [A] - \log K_A$$

Nestas circunstâncias, um valor de zero para a ordenada dará uma interceção do eixo dos x em que $\log [a] = \log K_A$. Por conseguinte, a concentração do membro de ligação que produz um $\log (DR-1) = 0$ será igual ao $\log K_A$, a constante

de dissociação de equilíbrio do complexo membro de ligação - recetor. Esta é uma quantificação independente do sistema da afinidade do membro de ligação que deve ser exata para todos os sistemas celulares contendo o recetor.

Uma vez que os valores de K_A são obtidos a partir de uma representação gráfica logarítmica, eles são logaritmos normalmente distribuídos. O logaritmo negativo desta concentração particular é referido empiricamente como pA_2 , a concentração de antagonista que produz um desvio duplo da curva de resposta em função da dose. A potência antagonista pode ser quantificada calculando pA_2 a partir de uma única concentração de antagonista que produz um único valor para a relação de dose a partir da equação, em que

$$pA_2 = \log (DR-1) - \log[a]$$

[a] = concentração molar de antagonista que torna necessário duplicar a concentração de agonista para desencadear a resposta submáxima original.

DR = a relação de dose é quantificada medindo a relação de concentrações de agonista igualmente ativas, medidas na presença e ausência do antagonista.

pA_2 pode ser calculado a partir dos dados de ensaio dose-resposta.

Inibição da diferenciação mediada por GM-CSF in vitro de progenitores de células sanguíneas no ensaio de formação de colónias

As células mononucleares de sangue periférico enriquecidas em células progenitoras hematopoiéticas foram obtidas de

dadores que sofreram mobilização de células progenitoras e aférese como parte do seu tratamento clínico padrão. As amostras foram desidentificadas e as células não foram conservadas criogenicamente antes da utilização. 5×10^4 células mononucleares foram cultivadas em ágar semissólido [107] na presença de GM-CSF humano a uma concentração final de 10 ng/mL. Os mAbs humanos amadurecidos por afinidade de ensaio, e o anticorpo murídeo conhecido 2B7, foram adicionados a culturas de ágar a uma concentração final de 10, 5, 1, 0,5, 0,1 ou 0,05 $\mu\text{g/mL}$. O mAb humano parental 28G5 e um mAb humano de controlo negativo de isotipo condizente, CAT001, foram avaliados a uma única concentração de 10 $\mu\text{g/mL}$. Para efeitos de controlo, os mAbs foram também avaliados quanto à sua aptidão para bloquear a formação de colónias estimulada por uma combinação de SCF, IL-3 e G-CSF (Croker et al., 2004) e quanto ao seu impacto na formação de colónias na ausência de citocinas. A formação de colónias (agregados de > 40 células) foi avaliada após 14 dias de incubação a 37°C com 10% de CO_2 em ar. As colónias foram fixadas com gluteraldeído e contadas utilizando um microscópio de dissecação a uma ampliação de 35X.

Inibição da atividade biológica do GM-CSF in vivo em ratos transgênicos com GM-CSFR $\alpha\beta$ humano

Foram gerados ratos transgênicos (Tg) que expressam ambas as cadeias α e β do GM-CSFR humano sob o controlo de um promotor de MHC de classe I e foram descritas as respostas do baço e células sanguíneas *in vivo* à administração de huGM-CSF [108]. Para a análise *in vivo* da atividade antagonista de mAbs específicos para huGM-CSFR α , pode utilizar-se o transplante da medula óssea de ratos Tg em ratos de tipo selvagem para gerar animais quiméricos de tal

forma que a expressão de huGM-CSFR $\alpha\beta$ transgênico está limitada às células hematopoiéticas derivadas da medula óssea, assemelhando-se, deste modo, mais de perto ao perfil de expressão do recetor endógeno. Nestes ratos quiméricos Tg com huGM-CSFR $\alpha\beta$ a administração de huGM-CSF leva a um aumento do peso do baço e à marginalização dos monócitos sanguíneos circulantes.

Geração de ratos quiméricos Tg:

Os fêmures e tíbias de ratos Tg dadores foram removidos e a medula óssea retirada com PBS estéril contendo 3% de soro fetal de vitelo (FCS). Os tampões de medula óssea foram em seguida sugados através de uma agulha 23G para obter uma suspensão de células simples, em seguida as células foram lavadas uma vez com PBS + 3% de FCS frio e feitas passar através de uma malha de aço inoxidável. Os glóbulos vermelhos foram em seguida removidos por lise em tampão de cloreto de amónio 0,168 M, após o que as células foram lavadas mais duas vezes com soro fisiológico tamponado com fosfato (PBS) + 3% de FCS, antes de terem sido feitas novamente passar através de uma malha de aço inoxidável. Para remover melhor as células mortas e os detritos celulares a suspensão foi centrifugada através de um leito de FCS. As células viáveis são recuperadas no sedimento, lavadas uma vez com PBS e ressuspensas em PBS a $2,5 \times 10^7$ /mL. Ratos C57/BL6 recetores com 5 a 8 semanas de idade foram irradiados letalmente com 2 doses de 550 Rad, com um intervalo de 3 horas. Os ratos recetores foram injetados por via intravenosa (i.v) com 0,2 mL da suspensão de células (isto é, 5×10^6 células/rato) e subsequentemente alojados em caixas cobertas com 0,02 M de neomicina na água de abeberamento durante 3 semanas. A reconstituição foi avaliada após 6 semanas através da análise de sangue

periférico por FACS utilizando mAbs específicos para as cadeias α e β do huGMCSFR.

Tratamento com GM-CSF e análise subsequente de ratos quiméricos Tg:

Ratos quiméricos Tg foram tratados duas vezes por dia por via subcutânea (s.c.) com 500 ng de huGM-CSF durante 4 dias. Para análise da atividade antagonista do anticorpo, grupos de 5 ratos foram administrados com doses selecionadas de mAb (ver abaixo) por via intraperitoneal (i.p.) 1 dia antes do início do tratamento com GM-CSF. No dia 5, colheu-se 0,2 mL de sangue para análise das populações de leucócitos circulantes, em particular monócitos sanguíneos, utilizando um sistema de hematologia ADVIA™ (Bayer Diagnostics). Os animais foram em seguida sacrificados e os baços retirados para medição dos pesos.

Inibição de TNF α e IL-6 humanos expressados endogenamente a partir de células mononucleares de sangue periférico humano: Camadas leucocitárias humanas (bolsa de sangue humano do Serviço de Transfusão de Sangue) foram aplicadas sobre um gradiente de densidade histopaque 1.077 (Sigma, N° cat. 1077-1) e as células foram centrifugadas a 400xg durante 40 minutos. Não foi aplicada qualquer travagem para parar a centrifugadora. As células PBMC foram em seguida colhidas da interface. As células foram lavadas em PBS e sedimentadas a 300xg durante 10 min, antes de os glóbulos vermelhos remanescentes terem sido submetidos a lise ressuspendendo em 20mL de água gelada durante 15s, seguida da adição imediata de NaCl a 1,6% gelado. As células foram em seguida sedimentadas a 1200rpm durante 5 min e ressuspendidas em 10mL de 10% de FBS/RPMI e 1% de penicilina estreptomicina. As células foram em seguida diluída a 5 x

10⁶/mL. Foram fornecidos 110µL de células por poço (5,5 × 10⁵/poço) e as células deixadas depositar durante 1 h a 37°C, 5% de CO₂. Os seguintes reagentes foram adicionados como controlos de concentração final única; PHA (5µg/mL), LPS (25µg/mL), GM-CSF (10ng/mL) e controlo de isotipo (50µg/mL). O Anticorpo 6 foi adicionado a uma concentração de partida final de 50µg/mL com uma diluição sucessiva de cinco vezes. As placas foram em seguida incubadas durante 72h a 37°C, 5% de CO₂. Os sobrenadantes foram colhidos após 72h e os níveis de TNFα e IL-6 foram calculados utilizando os seguintes kits R&D ELISA (sistema de desenvolvimento ELISA para hTNF-α R&D Duoset DY210 e sistema de desenvolvimento ELISA para hIL-6 R&D Duoset DY206). Os ELISA foram realizados de acordo com as recomendações dos fornecedores.

Quadro 1: Inibição da proliferação de células TF-1 induzida por GM-CSF pelos anticorpos de IgG4 de não-linha germinal isolados a partir da otimização de 28G5. A proliferação de células TF-1 foi induzida com uma única concentração de GM-CSF na presença de concentrações crescentes de anticorpos de IgG4. Foi medida a incorporação de timidina tritiada e foram calculados os valores de IC50 para os anticorpos. Os dados são representativos de n≥3. É mostrado o SEM (erro padrão da média).

IgG4	IC50 ± SEM (pM)
2B7	1575±490,5
anticorpo 1	5,3±0,33
anticorpo 2	15,0±4,71
anticorpo 4	48,0±8,33
anticorpo 5	9,3±5,39
anticorpo 6	0,97±0,033
anticorpo 7	93,8±24,6
anticorpo 8	34,5±2,63

IgG4	IC50 ± SEM (pM)
anticorpo 9	40,8±7,15
anticorpo 10	55,3±3,73
anticorpo 11	9,0±1,0
anticorpo 12	246,3±19,8
anticorpo 13	1106,0±174,9
anticorpo 14	16,3±4,9
anticorpo 15	163,8±7,3
anticorpo 16	12,8±3,3
anticorpo 17	14,3±2,8
anticorpo 18	13,3±3,4
anticorpo 19	23,8±4,3
anticorpo 20	9,8±2,8

Quadro 2: Análise cinética de anticorpos de IgG4 de não-linha germinal anti-GM-CSFR α isolados durante a otimização do 28G5. Os anticorpos de IgG4 foram imobilizados na superfície de um chip revestido com proteína-A e uma série de diluições de ECD de GM-CSF R α marcados para purificação foram feitas passar sobre a IgG4. Os dados foram sujeitos a ajuste utilizando a Langmuir 1:1 simultânea k_a k_d com permissão de transporte de massa.

IgG4	KD (nM)
anticorpo 1	0,264
anticorpo 2	0,376
anticorpo 4	4,07
anticorpo 5	0,847
anticorpo 6	0,139
anticorpo 7	3,93
anticorpo 8	0,552
anticorpo 10	1,50
anticorpo 12	3,02
anticorpo 14	0,502
anticorpo 15	1,03

IgG4	KD (nM)
anticorpo 16	1,14
anticorpo 17	0,193
anticorpo 19	0,388
anticorpo 20	0,127
Os dados para os anticorpos 9 e 11 foram difásicos	

Quadro 3: Inibição da alteração da forma de granulócitos humanos induzida por GM-CSF pelos anticorpos de IgG4 de não-linha germinal isolados durante a otimização do 28G5.

Os granulócitos humanos foram tratados com uma única concentração de GM-CSF na presença de concentrações crescentes de anticorpo de IgG4. A alteração na forma dos granulócitos foi medida utilizando citometria de fluxo e foram calculados os valores de IC50 para os anticorpos.

IgG4	IC50 ± SD (pM)
2B7	477±491
anticorpo 1	12,6±8,0
anticorpo 2	20,7±11,0
anticorpo 5	30,0
anticorpo 6	13,3±11,8
anticorpo 9	44,0
anticorpo 10	62,0
anticorpo 11	90,0
anticorpo 16	16,0
anticorpo 20	7,8

Quadro 4: Inibição de libertação de TNF α a partir de monócitos induzida por GM-CSF. Os monócitos humanos foram tratados com uma única concentração de GM-CSF na presença de concentrações crescentes de anticorpo de IgG4 de não-linha germinal. A libertação de TNF α foi medida por ELISA e foram calculados os valores de IC50 para os anticorpos.

IgG4	IC50 ± SD (pM)
anticorpo 1	78,8±54,6
anticorpo 2	103,3±63,1
anticorpo 5	67,0
anticorpo 6	43,0±19,7
anticorpo 9	74,0
anticorpo 10	139,0

Chave para a Listagem de Sequências

Na listagem de sequências apenas são listadas as sequências de ácidos nucleicos e aminoácidos ("PRT") para 20 clones de anticorpo, compreendendo o clone parental e os 19 clones do painel de otimização. Os anticorpos são numerados Ab1 a Ab20. O clone parental é o anticorpo 3, representado pelas SEQ ID NOS: 21-30 e SEQ ID NOS: 211-212.

A lista seguinte identifica por número as SEQ ID NOS nas quais são mostradas as sequências das moléculas indicadas:
(nt = sequência de nucleótido; aa = sequência de aminoácidos)

- 1 nt de VH de Anticorpo 01
- 2 aa de VH de Anticorpo 01
- 3 aa de CDR1 de VH de Anticorpo 01
- 4 aa de CDR2 de VH de Anticorpo 01
- 5 aa de CDR3 de VH de Anticorpo 01
- 6 nt de VL de Anticorpo 01
- 7 aa de VL de Anticorpo 01
- 8 aa de CDR1 de VL de Anticorpo 01
- 9 aa de CDR2 de VL de Anticorpo 01
- 10 aa de CDR3 de VL de Anticorpo 01
- 11 nt de VH de Anticorpo 02
- 12 aa de VH de Anticorpo 02
- 13 aa de CDR1 de VH de Anticorpo 02
- 14 aa de CDR2 de VH de Anticorpo 02
- 15 aa de CDR3 de VH de Anticorpo 02
- 16 nt de VL de Anticorpo 02
- 17 aa de VL de Anticorpo 02
- 18 aa de CDR1 de VL de Anticorpo 02
- 19 aa de CDR2 de VL de Anticorpo 02
- 20 aa de CDR3 de VL de Anticorpo 02

21 nt de VH de Anticorpo 03
22 aa de VH de Anticorpo 03
23 aa de CDR1 de VH de Anticorpo 03
24 aa de CDR2 de VH de Anticorpo 03
25 aa de CDR3 de VH de Anticorpo 03
26 nt de VL de Anticorpo 03
27 aa de VL de Anticorpo 03
28 aa de CDR1 de VL de Anticorpo 03
29 aa de CDR2 de VL de Anticorpo 03
30 aa de CDR3 de VL de Anticorpo 03
31 nt de VH de Anticorpo 04
32 aa de VH de Anticorpo 04
33 aa de CDR1 de VH de Anticorpo 04
34 aa de CDR2 de VH de Anticorpo 04
35 aa de CDR3 de VH de Anticorpo 04
36 nt de VL de Anticorpo 04
37 aa de VL de Anticorpo 04
38 aa de CDR1 de VL de Anticorpo 04
39 aa de CDR2 de VL de Anticorpo 04
40 aa de CDR3 de VL de Anticorpo 04
41 nt de VH de Anticorpo 05
42 aa de VH de Anticorpo 05
43 aa de CDR1 de VH de Anticorpo 05
44 aa de CDR2 de VH de Anticorpo 05
45 aa de CDR3 de VH de Anticorpo 05
46 nt de VL de Anticorpo 05
47 aa de VL de Anticorpo 05
48 aa de CDR1 de VL de Anticorpo 05
49 aa de CDR2 de VL de Anticorpo 05
50 aa de CDR3 de VL de Anticorpo 05
51 nt de VH de Anticorpo 06
52 aa de VH de Anticorpo 06
53 aa de CDR1 de VH de Anticorpo 06
54 aa de CDR2 de VH de Anticorpo 06
55 aa de CDR3 de VH de Anticorpo 06

56 nt de VL de Anticorpo 06
57 aa de VL de Anticorpo 06
58 aa de CDR1 de VL de Anticorpo 06
59 aa de CDR2 de VL de Anticorpo 06
60 aa de CDR3 de VL de Anticorpo 06
61 nt de VH de Anticorpo 07
62 aa de VH de Anticorpo 07
63 aa de CDR1 de VH de Anticorpo 07
64 aa de CDR2 de VH de Anticorpo 07
65 aa de CDR3 de VH de Anticorpo 07
66 nt de VL de Anticorpo 07
67 aa de VL de Anticorpo 07
68 aa de CDR1 de VL de Anticorpo 07
69 aa de CDR2 de VL de Anticorpo 07
70 aa de CDR3 de VL de Anticorpo 07
71 nt de VH de Anticorpo 08
72 aa de VH de Anticorpo 08
73 aa de CDR1 de VH de Anticorpo 08
74 aa de CDR2 de VH de Anticorpo 08
75 aa de CDR3 de VH de Anticorpo 08
76 nt de VL de Anticorpo 08
77 aa de VL de Anticorpo 08
78 aa de CDR1 de VL de Anticorpo 08
79 aa de CDR2 de VL de Anticorpo 08
80 aa de CDR3 de VL de Anticorpo 08
81 nt de VH de Anticorpo 09
82 aa de VH de Anticorpo 09
83 aa de CDR1 de VH de Anticorpo 09
84 aa de CDR2 de VH de Anticorpo 09
85 aa de CDR3 de VH de Anticorpo 09
86 nt de VL de Anticorpo 09
87 aa de VL de Anticorpo 09
88 aa de CDR1 de VL de Anticorpo 09
89 aa de CDR2 de VL de Anticorpo 09
90 aa de CDR3 de VL de Anticorpo 09

91 nt de VH de Anticorpo 10
92 aa de VH de Anticorpo 10
93 aa de CDR1 de VH de Anticorpo 10
94 aa de CDR2 de VH de Anticorpo 10
95 aa de CDR3 de VH de Anticorpo 10
96 nt de VL de Anticorpo 10
97 aa de VL de Anticorpo 10
98 aa de CDR1 de VL de Anticorpo 10
99 aa de CDR2 de VL de Anticorpo 10
100 aa de CDR3 de VL de Anticorpo 10
101 nt de VH de Anticorpo 11
102 aa de VH de Anticorpo 11
103 aa de CDR1 de VH de Anticorpo 11
104 aa de CDR2 de VH de Anticorpo 11
105 aa de CDR3 de VH de Anticorpo 11
106 nt de VL de Anticorpo 11
107 aa de VL de Anticorpo 11
108 aa de CDR1 de VL de Anticorpo 11
109 aa de CDR2 de VL de Anticorpo 11
110 aa de CDR3 de VL de Anticorpo 11
111 nt de VH de Anticorpo 12
112 aa de VH de Anticorpo 12
113 aa de CDR1 de VH de Anticorpo 12
114 aa de CDR2 de VH de Anticorpo 12
115 aa de CDR3 de VH de Anticorpo 12
116 nt de VL de Anticorpo 12
117 aa de VL de Anticorpo 12
118 aa de CDR1 de VL de Anticorpo 12
119 aa de CDR2 de VL de Anticorpo 12
120 aa de CDR3 de VL de Anticorpo 12
121 nt de VH de Anticorpo 13
122 aa de VH de Anticorpo 13
123 aa de CDR1 de VH de Anticorpo 13
124 aa de CDR2 de VH de Anticorpo 13
125 aa de CDR3 de VH de Anticorpo 13

126 nt de VL de Anticorpo 13
127 aa de VL de Anticorpo 13
128 aa de CDR1 de VL de Anticorpo 13
129 aa de CDR2 de VL de Anticorpo 13
130 aa de CDR3 de VL de Anticorpo 13
131 nt de VH de Anticorpo 14
132 aa de VH de Anticorpo 14
133 aa de CDR1 de VH de Anticorpo 14
134 aa de CDR2 de VH de Anticorpo 14
135 aa de CDR3 de VH de Anticorpo 14
136 nt de VL de Anticorpo 14
137 aa de VL de Anticorpo 14
138 aa de CDR1 de VL de Anticorpo 14
139 aa de CDR2 de VL de Anticorpo 14
140 aa de CDR3 de VL de Anticorpo 14
141 nt de VH de Anticorpo 15
142 aa de VH de Anticorpo 15
143 aa de CDR1 de VH de Anticorpo 15
144 aa de CDR2 de VH de Anticorpo 15
145 aa de CDR3 de VH Anticorpo 15
146 nt de VL de Anticorpo 15
147 aa de VL de Anticorpo 15
148 aa de CDR1 de VL de Anticorpo 15
149 aa de CDR2 de VL de Anticorpo 15
150 aa de CDR3 de VL de Anticorpo 15
151 nt de VH de Anticorpo 16
152 aa de VH de Anticorpo 16
153 aa de CDR1 de VH de Anticorpo 16
154 aa de CDR2 de VH de Anticorpo 16
155 aa de CDR3 de VH de Anticorpo 16
156 nt de VL de Anticorpo 16
157 aa de VL de Anticorpo 16
158 aa de CDR1 de VL de Anticorpo 16
159 aa de CDR2 de VL de Anticorpo 16
160 aa de CDR3 de VL de Anticorpo 16

161 nt de VH de Anticorpo 17
162 aa de VH de Anticorpo 17
163 aa de CDR1 de VH de Anticorpo 17
164 aa de CDR2 de VH de Anticorpo 17
165 aa de CDR3 de VH de Anticorpo 17
166 nt de VL de Anticorpo 17
167 aa de VL de Anticorpo 17
168 aa de CDR1 de VL de Anticorpo 17
169 aa de CDR2 de VL de Anticorpo 17
170 aa de CDR3 de VL de Anticorpo 17
171 nt de VH de Anticorpo 18
172 aa de VH de Anticorpo 18
173 aa de CDR1 de VH de Anticorpo 18
174 aa de CDR2 de VH de Anticorpo 18
175 aa de CDR3 de VH de Anticorpo 18
176 nt de VL de Anticorpo 18
177 aa de VL de Anticorpo 18
178 aa de CDR1 de VL de Anticorpo 18
179 aa de CDR2 de VL de Anticorpo 18
180 aa de CDR3 de VL de Anticorpo 18
181 nt de VH de Anticorpo 19
182 aa de VH de Anticorpo 19
183 aa de CDR1 de VH de Anticorpo 19
184 aa de CDR2 de VH de Anticorpo 19
185 aa de CDR3 de VH de Anticorpo 19
186 nt de VL de Anticorpo 19
187 aa de VL de Anticorpo 19
188 aa de CDR1 de VL de Anticorpo 19
189 aa de CDR2 de VL de Anticorpo 19
190 aa de CDR3 de VL de Anticorpo 19
191 nt de VH de Anticorpo 20
192 aa de VH de Anticorpo 20
193 aa de CDR1 de VH de Anticorpo 20
194 aa de CDR2 de VH de Anticorpo 20
195 aa de CDR3 de VH de Anticorpo 20

196 nt de VL de Anticorpo 20
197 aa de VL de Anticorpo 20
198 aa de CDR1 de VL de Anticorpo 20
199 aa de CDR2 de VL de Anticorpo 20
200 aa de CDR3 de VL de Anticorpo 20
201 Sequência de resíduos linear de GM-CSFR α
202 Sequência de aminoácidos completa de GM-CSFR α humano
203 Domínio extracelular de GM-CSFR α humano marcado com
FLAG
204 Péptido FLAG
205 Sequência de aminoácidos do domínio extracelular de
GM-CSFR α humano
206 GM-CSFR α maduro
207 nt de VL de Anticorpo 1
208 aa de VL de Anticorpo 1
209 nt de VL de Anticorpo 2
210 aa de VL de Anticorpo 2
211 nt de VL de Anticorpo 3
212 aa de VL de Anticorpo 3
213 nt de VL de Anticorpo 4
214 aa de VL de Anticorpo 4
215 nt de VL de Anticorpo 5
216 aa de VL de Anticorpo 5
217 nt de VL de Anticorpo 6
218 aa de VL de Anticorpo 6
219 nt de VL de Anticorpo 7
220 aa de VL de Anticorpo 7
221 nt de VL de Anticorpo 8
222 aa de VL de Anticorpo 8
223 nt de VL de Anticorpo 9
224 aa de VL de Anticorpo 9
225 nt de VL de Anticorpo 10
226 aa de VL de Anticorpo 10
227 nt de VL de Anticorpo 11
228 aa de VL de Anticorpo 11

229	nt de VL de Anticorpo	12
230	aa de VL de Anticorpo	12
231	nt de VL de Anticorpo	13
232	aa de VL de Anticorpo	13
233	nt de VL de Anticorpo	14
234	aa de VL de Anticorpo	14
235	nt de VL de Anticorpo	15
236	aa de VL de Anticorpo	15
237	nt de VL de Anticorpo	16
238	aa de VL de Anticorpo	16
239	nt de VL de Anticorpo	17
240	aa de VL de Anticorpo	17
241	nt de VL de Anticorpo	18
242	aa de VL de Anticorpo	18
243	nt de VL de Anticorpo	19
244	aa de VL de Anticorpo	19
245	nt de VL de Anticorpo	20
246	aa de VL de Anticorpo	20
247	nt de VH de Anticorpo	6
248	aa de VH de Anticorpo	6
249	nt de VL de Anticorpo	6
250	aa de VL de Anticorpo	6
251	aa de VH de FR1	
252	aa de VH de FR2	
253	aa de VH de FR3	
254	aa de VH de FR4	
255	aa de VL de FR1	
256	aa de VL de FR2	
257	aa de VL de FR3	
258	aa de VL de FR4	

As sequências de nucleótidos do domínio VL dos anticorpos 1 a 20 não incluem o codão gcg mostrado na extremidade 3' nas SEQ ID NOS: 6, 16, 26, 36, 46, 56, 66, 76, 86, 96, 106, 116, 126, 136, 146, 156, 166, 176, 186 e 196. Em

conformidade, as sequências de aminoácidos do domínio VL não incluem o resíduo Ala C-terminal (resíduo 113) nas SEQ ID NOS: 7, 17, 27, 37, 47, 57, 67, 77, 87, 97, 107, 117, 127, 137, 147, 157, 167, 177, 187 e 197, respectivamente. O resíduo Ala113 e codão gcg correspondente não foram expressados nos Anticorpos 1 a 20. Uma comparação das sequências escritas com os segmentos de genes da linha germinal, especialmente JL2, indica que o resíduo Ala e o codão gcg correspondente não fazem parte do domínio VL.

O resíduo de Gly na posição 112 estava presente nas sequências de scFv e IgG expressadas. No entanto, este resíduo não está presente nas sequências do segmento j da linha germinal humana que formam a região estrutural 4 do domínio VL, por exemplo JL2. O resíduo de Gly não é considerado como parte do domínio VL.

Para expressar a cadeia leve da IgG foi proporcionada uma sequência de nucleótidos que codifica a cadeia leve de anticorpo, compreendendo um primeiro exão que codifica o domínio VL, um segundo exão que codifica o domínio CL, e um intrão que separa o primeiro exão e o segundo exão. Em circunstâncias normais, o intrão é excisado pela maquinaria de processamento do ARNm celular, unindo a extremidade 3' do primeiro com a extremidade 5' do segundo exão. Assim, quando o ADN que possui a referida sequência de nucleótidos foi expressado como ARN, o primeiro e segundo exões foram unidos em conjunto. A tradução do ARN unido produz um polipéptido compreendendo os domínios VL e CL. Após excisão-união, a Gly na posição 112 é codificada pela última base (g) da sequência da estrutura 4 do domínio VL e pelas duas primeiras bases (gt) do domínio CL.

As sequências do domínio VL dos Anticorpos 1 a 20 são as SEQ ID NOS: 186 a 246, como indicado acima. As sequências

de nucleótidos do domínio VL terminam com cta como o codão final, e a Leu é o resíduo de aminoácido final nas sequências de aminoácidos correspondentes do domínio VL.

As sequências dos domínios VH e VL não tratados com linha germinal do Anticorpo 6 são mostradas nas SEQ ID NOS: 247 - 250, além das sequências dos domínios VH e VL tratados com linha germinal mostradas nas SEQ ID NOS: 51, 52, 56, 57, 216 e 217.

Referências

- 1 Haman et al., Journal of Biological Chemistry 274(48) :34155-34163 1999
- 2 Nicola NA; Wycherley A; Boyd AW; Layton JE; Cary D; Metcalf D Blood, 82(6) p1724-31 (1993)
- 3 Plückthun, A. Bio/Technology 9: 545-551 (1991)
- 4 Chadd HE e Chamow SM (2001) Current Opinion in Biotechnology 12: 188-194
- 5 Andersen DC e Krummen L (2002) Current Opinion in Biotechnology 13: 117
- 6 Larrick JW e Thomas DW (2001) Current Opinion in Biotechnology 12:411-418
- 7 Sambrook e Russell, Molecular Cloning: a Laboratory Manual: 3rd edition, 2001, Cold Spring Harbor Laboratory Press
- 8 Ausubel et al. eds., Short Protocols in Molecular Biology: A Compendium of Methods from Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, 4th edition 1999
- 9 Wold, et al. Multivariate data analysis in chemistry. Chemometrics -Mathematics and Statistics in Chemistry (Ed.: B. Kowalski), D. Reidel Publishing Company, Dordrecht, Holland, 1984 (ISBN 90-277-1846-6)
- 10 Norman et al. Applied Regression Analysis. Wiley-Interscience; 3rd edition (April 1998) ISBN: 0471170828

- 11 Kandel, Abraham e Backer, Eric. Computer-Assisted Reasoning in Cluster Analysis. Prentice Hall PTR, (May 11, 1995), ISBN: 0133418847
- 12 Krzanowski, Wojtek. Principles of Multivariate Analysis: A User's Perspective (Oxford Statistical Science Series, No 22 (Paper)). Oxford University Press; (December 2000), ISBN: 0198507089
- 13 Witten, Ian H. e Frank, Eibe. Data Mining: Practical Machine Learning Tools and Techniques with Java Implementations. Morgan Kaufmann; (October 11, 1999), ISBN: 1558605525
- 14 Denison David G. T. (Editor), Christopher C. Holmes, Bani K.
- 15 Ghose, Arup K. e Viswanadhan, Vellarkad N.. Combinatorial Library Design and Evaluation Principles, Software, Tools, and Applications in Drug Discovery. ISBN: 0-8247-0487-8
- 16 Chothia C. et al. Journal Molecular Biology (1992) 227, 799-817
- 17 Al-Lazikani, et al. Journal Molecular Biology (1997) 273(4), 927-948
- 18 Chothia, et al. Science, 223,755-758 (1986)
- 19 Whitelegg, N.R.u. e Rees, A.R (2000). Prot. Eng., 12, 815-824
- 20 Guex, N. e Peitsch, M.C. Electrophoresis (1997) 18, 2714-2723
- 21 Voet e Voet, Biochemistry, 2nd Edition, (Wiley) 1995.
- 22 Marks et al Bio/Technology, 1992, 10:779-783
- 23 Kay, B.K., Winter, J., e McCafferty, J. (1996) Phage Display of Peptides and Proteins: A Laboratory Manual, San Diego: Academic Press.
- 24 Stemmer, Nature, 1994, 370:389-391
- 25 Gram et al., 1992, Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 89:3576-3580

- 26 Barbas et al., 1994, Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 91:3809-3813
- 27 Schier et al., 1996, J. Mol. Biol. 263:551-567
- 28 Ledermann J.A. et al. (1991) Int. J. Cancer 47: 659-664
- 29 Bagshawe K.D. et al. (1991) Antibody, Immunoconjugates and Radiopharmaceuticals 4: 915-922
- 30 Robinson, J. R. ed., Sustained and Controlled Release Drug Delivery Systems, Marcel Dekker, Inc., New York, 1978
- 31 Ritz, S. A., M. J. Cundall, et al. (2002). Am J Respir Cell Mol Biol 27(4): 428-35.
- 32 Ritz, S. A., M. R. Stampfli, et al. (2002). Trends Immunol 23 (8) : 396-402.
- 33 WOOLLEY, K.L., et al. (1995). Am J Respir Crit Care Med, 151, 1915-24.
- 34 Kotsimbos, A. T., M. Humbert, et al. (1997). J Allergy Clin Immunol 99(5): 666-72.
- 35 Yamashita N. et al., Cell. Immunol 2002 oct; 219(2); 92-97
- 36 Ohta K., et al. J Allergy Clin Immunol. 1999 Nov; 104(5): 1024-30
- 37 Stampfli, M. R., R. E. Wiley, et al. (1998). J Clin Invest 102(9): 1704-14.
- 38 Cates, E. C., B. U. Gajewska, et al. (2003). J Allergy Clin Immunol 111(5): 1076-86.
- 39 CAMPBELL, I.K., et al. (1997) Annal Res Dis, 56, 364-368.
- 40 BISCHOF, R.J., D. ZAFIROPOULOS, J. A. HAMILTON AND I. K. CAMPBELL (2000) Clin Exp Immunol, 119, 361-367.
- 41 Campbell, I. K., M. J. Rich, et al. (1998). J Immunol 161(7): 3639-44.
- 42 Hamilton, J. A. (2002). Trends Immunol 23(8): 403-8.
- 43 YANG, Y.H. e J.A. HAMILTON (2001) Arthritis Rheumatol, 44, 111-119
- 44 Cook, A. D., E. L. Braine, et al. (2001). Arthritis Res 3(5): 293-8.

- 45 Field, M. and L. Clinton (1993). *The Lancet* 342: 1244.
- 46 Firestein GS, Alvaro-Gracia JM, Maki R. 1990 *J. Immunol* may 1; 144(9): 3347-53
- 47 Leizer T, et al. 1990 *Blood* 1990 Nov 15; 76(10): 1989-96
- 48 Fiehn C, et al., *Z Rheumatol* 1992 May-Jun; 51 (3): 1221-126
- 49 de Vries, E.G., et al. (1991) *Lancet*, 338, 517-518.
- 50 Hazenberg BP, et al. *Blood* 1989 Dec; 74(8): 2769-70
- 51 Barnes e Hansel (2004). *Lancet*, 364:985-96.
- 52 Barnes, P.J. (2000). *Chest*, 117:10S-14S
- 53 McManus, T. E., et al (2005) American Thoracic Society Meeting, May 2005.
- 54 Vlahos, R., et al. (2005). "GM-CSF is a key pathogenic mediator in experimental COPD." European Respiratory Society Meeting, Sept 2005
- 55 McQualter JL, et al. (2001) *J Exp Med*. 194: 873-82
- 56 Bagby GC Jr, et al. 1988 *J Clin Invest*. 4: 1430-6.
- 57 Estrov Z, et al. (1986) *Cancer Res*. 46: 6456-61.
- 58 Barak Y, et al. 1981 *Am J Hematol*. 10: 269-75.
- 59 Gualtieri RJ, et al. 1988 *Exp Hematol*. 16:613-9.
- 60 Suda T, et al. 1982 *Leuk Res*. 6: 43-53.
- 61 Gualtieri RJ, et al. 1989 *Blood*. 74: 2360-7
- 62 Largaespada DA, et al. (1996) *Nat. Genet*. 12: 137-43
- 63 Iversen, P. O., et al. (1997). *Blood* 90(12): 4910-7.
- 64 Wang et al., 1994 *Exp mol Pathol*
- 65 Plenz et al., *Art. Thrombosis and Vascular biology* 1997
- 66 Takashi et al., 1996 *Circulation* 93, 1185-1193
- 67 Biwa T et al., *JBC* 1998 273: 28305-28313
- 68 Makheja et al., *Atherosclerosis* 1989, 76 155-661
- 69 Naito et al., 1992 *J Nutri sci Vitamin* 38: 255-264
- 70 Hayashi et al., *Atherosclerosis* 1991 91: 107-116
- 71 Villa et al 1994 *J Clin Invest* 93: 1243
- 72 Van Put DJ et al., 1995 *Eur J Pharmacol* 294: 753-761
- 73 Voisard et al., 1994 *Int J Cardiol* 43: 257-267
- 74 Yamada et al., 1993: *Artery* 20: 253-267

- 75 Sakai et al., 1999 *Arterioscler Thromb vasc biol* 19: 1726-1733
- 76 Gearing, et al. *EMBO J.* 8 (12): 3667-3676 (1989)
- 77 Crosier, K. et al. *PNAS* 88:7744-7748 1991
- 78 Raines, M. et al. *PNAS* 88:8203-8207 1991
- 79 Wess, L. In: *BioCentury, The Bernstein Report on BioBusiness*, 12(42), A1-A7, 2004
- 80 Haan & Maggos (2004) *BioCentury*, 12(5): A1-A6
- 81 Koide et al. (1998) *Journal of Molecular Biology*, 284: 1141-1151.
- 82 Nygren et al. (1997) *Current Opinion in Structural Biology*, 7: 463-469
- 83 Kontermann, R e Dubel, S, *Antibody Engineering*, Springer-Verlag New York, LLC; 2001, ISBN: 3540413545
- 84 Mendez, M. et al. (1997) *Nature Genet*, 15(2): 146-156
- 85 Knappik et al. *J. Mol. Biol.* (2000) 296, 57-86
- 86 Krebs et al. *Journal of Immunological Methods* 254 2001 67-84
- 87 Ward, E.S. et al., *Nature* 341, 544-546 (1989)
- 88 McCafferty et al (1990) *Nature*, 348, 552-554
- 89 Holt et al (2003) *Trends in Biotechnology* 21, 484-490
- 90 Bird et al, *Science*, 242, 423-426, 1988;
- 91 Huston et al, *PNAS USA*, 85, 5879-5883, 1988
- 92 Holliger, P. et al, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90 6444-6448, 1993
- 93 Reiter, Y. et al, *Nature Biotech*, 14, 1239-1245, 1996
- 94 Hu, S. et al, *Cancer Res.*, 56, 3055-3061, 1996.
- 95 Holliger, P. e Winter G. *Current Opinion Biotechnol* 4, 446-449 1993
- 96 Ridgeway, J. B. B. et al, *Protein Eng.*, 9, 616-621, 1996
- 97 *Ann N Y Acad Sci.* 1971 Dec 31;190:382-93.
- 98 Kabat, E.A. et al, *Sequences of Proteins of Immunological Interest.* 4th Edition. US Department of Health and Human Services. 1987

- 99 Kabat, E.A. et al. (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Edition. US Department of Health and Human Services, Public Service, NIH, Washington.
- 100 Persic et al 1997 Gene 187; 9-18
- 101 Hanes J et al (2000) Methods in Enzymology, Vol 328:24.
- 102 Vaughan TJ et al (1996) Nature Biotechnology Vol 14:309
- 103 Sloodstra-JW; Puijk-WC; Ligtoet-GJ; Langeveld-JP; Melen-RH (1996). Mol-Divers. 1: 87-96
- 104 W001/66754 Cambridge Antibody Technology Limited; Vaughan; Wilton; Smith; Main
- 105 P.K. Smith, et al., Anal. Biochem. 150 (1985), pp. 76-85
- 106 S. Mizushima e S. Nagata Nucleic Acids Research, Vol 18; No 17 1990 pp 5322
- 107 Clin Haematol. 1979 Jun;8(2):263-85. Metcalf D.
- 108 Nishijima, I., T. Nakahata, et al. (1997). Blood 90(3): 1031-8.

<110> MedImmune Limited

<110> Zenyth Operations Pty Ltd

<120> MEMBRO DE LIGAÇÃO PARA O RECETOR DE GM-CSF

<130> HMK/FP6767412

<140> EP

<141> 2007-03-27

<150> EP 07712963.3

<151> 2007-03-27

<150> PCT/GB2007/001108

<151> 2007-03-27

<150> US 60/786569

<151> 2006-03-27

<160> 258

<170> Software de patentes Cambridge Antibody Technology
versão 1.0

<210> 1

<211> 360

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<220>

<223> Ab1

<400> 1

cagggtcagc tgggtcaatc tggggctgag gtgaagaagc ctggggcctc agtgaaggtc 60
tcatgtaaag tttccggata caccctcact gaactgtcca tccactgggt gcgacaggct 120
cccgaaaag gacttgagtg gatgggagga tttgatcctg aagagaatga aatagtctac 180
gcacagaggt tccagggcag agtcaccatg accgaggaca catctacaga cacggcctac 240
atggaactga gcagcctgag atccgaggac acggccgttt attattgtgc aatagtgggg 300
tctttcagtg gcatcgcta tgcgccctgg ggccaagga caatggtcac cgtctcctca 360

<210> 2

<211> 120

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> Ab1

<400> 2

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

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Val Ser Gly Tyr Thr Leu Thr Glu Leu
 20 25 30

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

Gly Gly Phe Asp Pro Glu Glu Asn Glu Ile Val Tyr Ala Gln Arg Phe
 50 55 60

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

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

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

Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser

115

120

<210> 3

<211> 5

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> Ab1

<400> 3

Glu Leu Ser Ile His

5

<210> 4

<211> 17

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> Ab1

<400> 4

Gly Phe Asp Pro Glu Glu Asn Glu Ile Val Tyr Ala Gln Arg Phe Gln

5

10

15

Gly

<210> 5

<211> 11

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> Ab1

<400> 5

Val Gly Ser Phe Ser Gly Ile Ala Tyr Arg Pro

5

10

<210> 6

<211> 339

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<220>

<223> Ab1

<400> 6

```
cagtctgtgc tgactcagcc gccctcagtg tctggggccc cagggcagag ggtcaccatc      60
tcctgtactg ggagcggctc caacatcggg gcaccttatg atgtaagctg gtaccagcag      120
cttccaggaa cagcccccaa actcctcatc tatcataaca acaagcggcc ctcaggggctc      180
cctgaccgat tctctggctc caagtctggc acctcagcct ccctggccat cactgggctc      240
caggctgagg atgaggctga ttattactgc cagtcctatg acagcagctc gatcagcagc      300
attttcggcg gagggaccaa gctcaccgct ctaggtgcg                                339
```

<210> 7

<211> 113

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> Ab1

<400> 7

<210> 9

<211> 7

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> Ab1

<400> 9

His Asn Asn Lys Arg Pro Ser

5

<210> 10

<211> 11

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> Ab1

<400> 10

Gln Ser Tyr Asp Ser Ser Ser Ile Ser Thr Ile

5

10

<210> 11

<211> 360

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<220>

<223> Ab2

<400> 11

caggtgcagc tggtgcaatc tggggctgag gtgaagaagc ctggggcctc agtgaaggtc 60
tcatgtaaaa tttccggaca cagcctcagt gaactgtcca tccactgggt gcgacagact 120
cccacaaaag gatttgagtg gatgggagga tttgatcctg aagagaatga aatagtctac 180
gcacagaggt tccagggcag agtcaccatg accgaggaca catctataga cacggcctac 240
ctgaccctga gcagcctgag atccgacgac acggccgttt attattgttc aatagtgggg 300
tctttcagtg gccccgcctt gcgcccctgg ggcaaagga caatggtcac cgtctcgagt 360

<210> 12

<211> 120

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> Ab2

<400> 12

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

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ile Ser Gly His Ser Leu Ser Glu Leu
 20 25 30

Ser Ile His Trp Val Arg Gln Thr Pro Thr Lys Gly Phe Glu Trp Met
 35 40 45

Gly Gly Phe Asp Pro Glu Glu Asn Glu Ile Val Tyr Ala Gln Arg Phe
 50 55 60

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

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

Ser Ile Val Gly Ser Phe Ser Gly Pro Ala Leu Arg Pro Trp Gly Lys
 100 105 110

Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 13

<211> 5

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> Ab2

<400> 13

Glu Leu Ser Ile His

5

<210> 14
<211> 17
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> Ab2

<400> 14
Gly Phe Asp Pro Glu Glu Asn Glu Ile Val Tyr Ala Gln Arg Phe Gln
 5 10 15

Gly

<210> 15
<211> 11
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> Ab2

<400> 15
Val Gly Ser Phe Ser Gly Pro Ala Leu Arg Pro
 5 10

<210> 16
<211> 339
<212> ADN
<213> Homo sapiens

<220>
<223> Ab2

<400> 16

caggctgtgc tgactcagcc gtcctcagtg tctggggccc cagggcagag ggtcaccatc 60
 tcctgtactg ggagcggctc caacatcggg gcaccttatg atgtaagctg gtaccagcag 120
 cttccaggaa cagcccccaa actcctcadc taccataaca acaagcggcc ctcaggggtc 180
 cctgaccgat tctctgcctc caagtctggc acctcagcct ccctggccat cactgggctc 240
 caggctgacg atgaggctga ttattactgc cagtcctatg acagcagcct gagtgggttcg 300
 gttttcggcg gagggaccaa ggtcaccgtc ctaggtgcc 339

<210> 17

<211> 113

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> Ab2

<400> 17

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

Ser Ala Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Ser Leu Ala Ile Thr Gly Leu
 65 70 75 80

Gln Ala Asp Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Ser Tyr Asp Ser Ser
 85 90 95

Leu Ser Gly Ser Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Thr Val Leu Gly
 100 105 110

Ala

<210> 18

<211> 14

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> Ab2

<400> 18

Thr Gly Ser Gly Ser Asn Ile Gly Ala Pro Tyr Asp Val Ser
 5 10

<210> 19

<211> 7

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> Ab2

<400> 19

His Asn Asn Lys Arg Pro Ser
 5

<210> 20
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<220>
 <223> Ab2

<400> 20
 Gln Ser Tyr Asp Ser Ser Leu Ser Gly Ser Val
 5 10

<210> 21
 <211> 360
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

<220>
 <223> Ab3

<400> 21
 caggTgcagc tggTgcaatc tggggctgag gtgaagaagc ctggggcctc agtgaaggtc 60
 tcatgtaaaa tttccggaca cagcctcagt gaactgtcca tccactgggt gcgacagact 120
 cccacaaaag gatttgagtg gatgggagga tttgatcctg aagagaatga aatagtctac 180
 gcacagaggt tccagggcag agtcacatg accgaggaca catctataga cacggcctac 240
 ctgaccctga gcagcctgag atccgacgac acggccgttt attattgttc aatagtgggg 300
 tctttcagtg gctgggcctt tgactactgg ggcaaagga caatggtcac cgtctcgagt 360

<210> 22
 <211> 120

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> Ab3

<400> 22

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

5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ile Ser Gly His Ser Leu Ser Glu Leu

20 25 30

Ser Ile His Trp Val Arg Gln Thr Pro Thr Lys Gly Phe Glu Trp Met

35 40 45

Gly Gly Phe Asp Pro Glu Glu Asn Glu Ile Val Tyr Ala Gln Arg Phe

50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Glu Asp Thr Ser Ile Asp Thr Ala Tyr

65 70 75 80

Leu Thr Leu Ser Ser Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys

85 90 95

Ser Ile Val Gly Ser Phe Ser Gly Trp Ala Phe Asp Tyr Trp Gly Lys

100 105 110

Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser

115 120

<210> 23

<211> 5

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> Ab3

<400> 23

Glu Leu Ser Ile His

5

<210> 24

<211> 17

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> Ab3

<400> 24

Gly Phe Asp Pro Glu Glu Asn Glu Ile Val Tyr Ala Gln Arg Phe Gln

5

10

15

Gly

<210> 25

<211> 11

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> Ab3

<400> 25

Val Gly Ser Phe Ser Gly Trp Ala Phe Asp Tyr

5

10

<210> 26

<211> 339

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<220>

<223> Ab3

<400> 26

```

caggctgtgc tgactcagcc gtcctcagtg tctggggccc cagggcagag ggtcaccatc      60
tcctgtactg ggagcggctc caacatcggg gcaccttatg atgtaagctg gtaccagcag      120
cttccaggaa cagcccccaa actcctcatc taccataaca acaagcggcc ctcaggggctc      180
cctgaccgat tctctgcctc caagtctggc acctcagcct ccctggccat cactgggctc      240
caggctgacg atgaggctga ttattactgc cagtcctatg acagcagcct gagggttcg      300
gttttcgggg gagggaccaa ggtcaccgtc ctaggtgcg                                339

```

<210> 27

<211> 113

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> Ab3

<400> 27

```

Gln Ala Val Leu Thr Gln Pro Ser Ser Val Ser Gly Ala Pro Gly Gln
          5                10                15

Arg Val Thr Ile Ser Cys Thr Gly Ser Gly Ser Asn Ile Gly Ala Pro
          20                25                30

```

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

Leu Ile Tyr His Asn Asn Lys Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe
 50 55 60

Ser Ala Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Ser Leu Ala Ile Thr Gly Leu
 65 70 75 80

Gln Ala Asp Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Ser Tyr Asp Ser Ser
 85 90 95

Leu Ser Gly Ser Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Thr Val Leu Gly
 100 105 110

Ala

<210> 28

<211> 14

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> Ab3

<400> 28

Thr Gly Ser Gly Ser Asn Ile Gly Ala Pro Tyr Asp Val Ser
 5 10

<210> 29

<211> 7

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> Ab3

<400> 29

His Asn Asn Lys Arg Pro Ser

5

<210> 30

<211> 11

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> Ab3

<400> 30

Gln Ser Tyr Asp Ser Ser Leu Ser Gly Ser Val

5

10

<210> 31

<211> 360

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<220>

<223> Ab4

<400> 31

cagggtgcagc tgggtgcaatc tggggctgag gtgaagaagc ctggggcctc agtgaaggtc 60
 tcacgtaaaa tttccggaca cagcctcagt gaactgtcca tccactgggt gcgacagact 120
 cccacaaaag gatttgagtg gatgggagga tttgatcctg aagagaatga aatagtctac 180
 gcacagaggt tccagggcag agtcaccatg accgaggaca catctataga cacggcctac 240
 ctgaccctga gcagcctgag atccgacgac acggccgttt attattgtgc aatagtgggg 300
 tctttcagtc ccccgaccta cgggtactgg ggcaaagga caatggtcac cgtctcgagt 360

<210> 32

<211> 120

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> Ab4

<400> 32

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
 5 10 15
 Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ile Ser Gly His Ser Leu Ser Glu Leu
 20 25 30

Ser Ile His Trp Val Arg Gln Thr Pro Thr Lys Gly Phe Glu Trp Met
 35 40 45

Gly Gly Phe Asp Pro Glu Glu Asn Glu Ile Val Tyr Ala Gln Arg Phe
 50 55 60

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

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

Ala Ile Val Gly Ser Phe Ser Pro Pro Thr Tyr Gly Tyr Trp Gly Lys
 100 105 110

Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 33

<211> 5

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> Ab4

<400> 33

Glu Leu Ser Ile His
 5

<210> 34

<211> 17

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> Ab4

<400> 34

Gly Phe Asp Pro Glu Glu Asn Glu Ile Val Tyr Ala Gln Arg Phe Gln
 5 10 15

Gly

<210> 35

<211> 11

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> Ab4

<400> 35

Val Gly Ser Phe Ser Pro Pro Thr Tyr Gly Tyr
 5 10

<210> 36

<211> 339

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<220>

<223> Ab4

<400> 36

caggctgtgc tgactcagcc gtcctcagtg tctggggccc cagggcagag ggtcaccatc 60
tcctgtactg ggagcggctc caacatcggg gcaccttatg atgtaagctg gtaccagcag 120
cttccaggaa cagcccccaa actcctcatc tatkataaca acaagcggcc ctcaggggtc 180
cctgaccgat tctctgctc caagtctggc acctcagcct ccctggccat cactgggctc 240
caggctgacg atgaggctga ttattactgc cagtcctatg acagcagcct gagtgggttcg 300
gttttcggcg gagggaccaa ggtcaccgtc ctaggtgcg 339

<210> 37

<211> 113

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> Ab4

<400> 37

<210> 39
<211> 7
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> Ab4
<400> 39

His Asn Asn Lys Arg Pro Ser
5

<210> 40
<211> 11
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> Ab4

<400> 40
Gln Ser Tyr Asp Ser Ser Leu Ser Gly Ser Val
5 10

<210> 41
<211> 360
<212> ADN
<213> Homo sapiens

<220>
<223> Ab5

<400> 41

caggtgcagc tgggtcaatc tggggctgag gtgaagaagc ctggggcctc agtgaaggtc 60
 tcatgtaaaa tttccggaca cagcctcagt gaactgtcca tccactgggt gcgacagact 120
 cccacaaaag gatttgagtg gatgggagga tttgatcctg aagagaatga aatagtctac 180
 gcacagaggt tccagggcag agtcacatg accgaggaca catctataga cacggcctac 240
 ctgaccctga gcagcctgag atccgacgac acggccgttt attattgtgc aatagtgggg 300
 tctttcagtg gctaccctta ccgcccgtgg ggccaagga caatggtcac cgtctcgagt 360

<210> 42

<211> 120

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> Ab5

<400> 42

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

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ile Ser Gly His Ser Leu Ser Glu Leu
 20 25 30

Ser Ile His Trp Val Arg Gln Thr Pro Thr Lys Gly Phe Glu Trp Met
 35 40 45

Gly Gly Phe Asp Pro Glu Glu Asn Glu Ile Val Tyr Ala Gln Arg Phe
 50 55 60

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

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

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

Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 43

<211> 5

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> Ab5

<400> 43

Glu Leu Ser Ile His

5

<210> 44

<211> 17

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> Ab5

<400> 44

Gly Phe Asp Pro Glu Glu Asn Glu Ile Val Tyr Ala Gln Arg Phe Gln
5 10 15

Gly

<210> 45

<211> 11

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> Alb5

<400> 45

val Gly Ser Phe Ser Gly Tyr Pro Tyr Arg Pro
5 10

<210> 46

<211> 339

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<220>

<223> Ab5

<400> 46

<210> 50

<211> 11

<212>

PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> Ab5

<400> 50

Gln Ser Tyr Asp Ser Ser Leu Ser Gly Ser Val

5

10

<210> 51

<211> 360

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<220>

<223> Ab6

<400> 51

cagggtccagc tgggtgcaatc tggggctgag gtgaagaagc ctggggcctc agtgaaggtc 60

tcatgtaaag tttccggata caccctcact gaactgtcca tccactgggt gcgacaggct 120

cccgaaaag gacttgagtg gatgggagga tttgatcctg aagagaatga aatagtctac 180

gcacagaggt tccagggcag agtcacatg accgaggaca catctacaga cacggcctac 240

atggaactga gcagcctgag atccgaggac acggccgttt attattgtgc aatagtgggg 300

tctttcagtc ccttgacctt gggcctctgg ggccaagga caatggtcac cgtctcctca 360

<210> 52

<211> 120

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> Ab6

<400> 52

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

<210> 53

<211> 5

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> Ab6

<400> 53

Glu Leu Ser Ile His

5

<210> 54

<211> 17

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> Ab6

<400> 54

Gly Phe Asp Pro Glu Glu Asn Glu Ile Val Tyr Ala Gln Arg Phe Gln

5

10

15

Gly

<210> 55

<211> 11

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> Ab6

<400> 55

Val Gly Ser Phe Ser Pro Leu Thr Leu Gly Leu

5

10

<210> 56

<211> 339

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<220>

<223> Ab6

<400> 56

```
cagtctgtgc tgactcagcc gccctcagtg tctggggccc cagggcagag ggtcaccatc      60
tcctgtactg ggagcggctc caacatcggg gcaccttatg atgtaagctg gtaccagcag      120
cttccaggaa cagcccccaa actcctcatc tatcataaca acaagcggcc ctcaggggctc      180
cctgaccgat tctctggctc caagtctggc acctcagcct ccttgccat cactgggctc      240
caggctgagg atgaggctga ttattactgc gcgaccgttg aggccggcct gagtggttcg      300
gttttcggcg gagggaccaa gctgaccgtc ctaggtgcg                               339
```

<210> 57

<211> 113

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> Ab6

<400> 57

Gln Ser Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Gly Ala Pro Gly Gln
5 10 15

Arg Val Thr Ile Ser Cys Thr Gly Ser Gly Ser Asn Ile Gly Ala Pro
20 25 30

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

Leu Ile Tyr His Asn Asn Lys Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe
50 55 60

Ser Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Ser Leu Ala Ile Thr Gly Leu
65 70 75 80

Gln Ala Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ala Thr Val Glu Ala Gly
85 90 95

Leu Ser Gly Ser Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly
100 105 110

Ala

<210> 58

<211> 14

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> Ab6

<400> 58

Thr Gly Ser Gly Ser Asn Ile Gly Ala Pro Tyr Asp Val Ser
5 10

<210> 59

<211> 7

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> Ab6

<400> 59

His Asn Asn Lys Arg Pro Ser

5

<210> 60

<211> 11

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> Ab6

<400> 60

Ala Thr Val Glu Ala Gly Leu Ser Gly Ser Val

5

10

<210> 61

<211> 360

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<220>

<223> Ab7

<400> 61

cagggtgcagc tgggtgcaatc tggggctgag gtgaagaagc ctggggcctc agtgaaggtc 60
 tcatgtaaaa tttccggaca cagcctcagt gaactgtcca tccactgggt gcgacagact 120
 cccacaaaag gatttgagtg gatgggagga tttgatcctg aagagaatga aatagtctac 180
 gcacagaggt tccagggcag agtcaccatg accgaggaca catctataga cacggcctac 240
 ctgaccctga gcagcctgag atccgacgac acggccgttt attattgtgc aatagtgggg 300
 tctttcagtg gccccgtgta cggcctctgg ggcaaagga caatggtcac cgtctcgagt 360

<210> 62

<211> 120

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> Ab7

<400> 62

Gln	Val	Gln	Leu	Val	Gln	Ser	Gly	Ala	Glu	Val	Lys	Lys	Pro	Gly	Ala
			5						10					15	
Ser	Val	Lys	Val	Ser	Cys	Lys	Ile	Ser	Gly	His	Ser	Leu	Ser	Glu	Leu
			20						25					30	
Ser	Ile	His	Trp	Val	Arg	Gln	Thr	Pro	Thr	Lys	Gly	Phe	Glu	Trp	Met
			35						40					45	

Gly Gly Phe Asp Pro Glu Glu Asn Glu Ile Val Tyr Ala Gln Arg Phe
 50 55 60

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

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

Ala Ile Val Gly Ser Phe Ser Gly Pro Val Tyr Gly Leu Trp Gly Lys
 100 105 110

Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 63

<211> 5

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> Ab7

<400> 63

Glu Leu Ser Ile His

5

<210> 64

<211> 17

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> Ab7

<400> 64

Gly Phe Asp Pro Glu Glu Asn Glu Ile Val Tyr Ala Gln Arg Phe Gln
 5 10 15

Gly

<210> 65

<211> 11

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> Ab7

<400> 65

Val Gly Ser Phe Ser Gly Pro Val Tyr Gly Leu
 5 10

<210> 66

<211> 339

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<220>

<223> Ab7

<400> 66

caggctgtgc tgactcagcc gtcctcagtg tctggggccc cagggcagag ggcaccatc 60

tcctgtactg ggagcggctc caacatcggg gcaccttatg atgtaagctg gtaccagcag 120

cttccaggaa cagcccccaa actcctcatc tatcataaca acaagcggcc ctcaggggctc 180

cctgaccgat tctctgcctc caagtctggc acctcagcct ccctggccat cactgggctc 240

caggctgacg atgaggctga ttattactgc cagtcctatg acagcagcct gagtggttcg 300

gttttcggcg gagggaccaa ggtcacctgc ctaggtgcg 339

<210> 67

<211> 113

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> Ab7

<400> 67

Gln Ala Val Leu Thr Gln Pro Ser Ser Val Ser Gly Ala Pro Gly Gln
5 10 15

Arg Val Thr Ile Ser Cys Thr Gly Ser Gly Ser Asn Ile Gly Ala Pro
20 25 30

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

Leu Ile Tyr His Asn Asn Lys Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe
50 55 60

Ser Ala Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Ser Leu Ala Ile Thr Gly Leu
65 70 75 80

Gln Ala Asp Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Ser Tyr Asp Ser Ser

85
90
95

Leu Ser Gly Ser Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Thr Val Leu Gly
100
105
110

Ala

<210> 68

<211> 14

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> Ab7

<400> 68

Thr Gly Ser Gly Ser Asn Ile Gly Ala Pro Tyr Asp Val Ser
5
10

<210> 69

<211> 7

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> Ab7

<400> 69

His Asn Asn Lys Arg Pro Ser
5

<210> 70

<211> 11

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> Ab7

<400> 70

Gln Ser Tyr Asp Ser Ser Leu Ser Gly Ser Val

5

10

<210> 71

<211> 360

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<220>

<223> Ab8

<400> 71

caggtgcagc tggtgcaatc tggggctgag gtgaagaagc ctggggcctc agtgaaggtc 60

tcatgtaaaa tttccggaca cagcctcagt gaactgtcca tccactgggt gcgacagact 120

cccacaaaag gatttgagtg gatgggagga tttgatcctg aagagaatga aatagtctac 180

gcacagaggt tccagggcag agtcaccatg accgaggaca catctataga cacggcctac 240

ctgaccctga gcagcctgag atccgacgac acggccgttt attattgtgc aatagtgggg 300

tctttcagtc ccccgcccta ccgcccctgg ggcaaagga caatggtcac cgtctcgagt 360

<210> 72

<211> 120

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> Ab8

<400> 72

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

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ile Ser Gly His Ser Leu Ser Glu Leu
 20 25 30

Ser Ile His Trp Val Arg Gln Thr Pro Thr Lys Gly Phe Glu Trp Met
 35 40 45

Gly Gly Phe Asp Pro Glu Glu Asn Glu Ile Val Tyr Ala Gln Arg Phe
 50 55 60

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

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

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

Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 73

<211> 5

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> Ab8

<400> 73

Glu Leu Ser Ile His

5

<210> 74

<211> 17

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> Ab8

<400> 74

Gly Phe Asp Pro Glu Glu Asn Glu Ile Val Tyr Ala Gln Arg Phe Gln

5

10

15

Gly

<210> 75

<211> 11

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> Ab8

<400> 75

Val Gly Ser Phe Ser Pro Pro Ala Tyr Arg Pro

5

10

<210> 76

<211> 339

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<220>

<223> Ab8

<400> 76

```
caggctgtgc tgactcagcc gtcctcagtg tctggggccc cagggcagag ggtcaccatc      60
tcctgtactg ggagcggctc caacatcggg gcaccttatg atgtaagctg gtaccagcag      120
cttccaggaa cagcccccaa actcctcatc tatcataaca acaagcggcc ctcaggggctc      180
cctgaccgat tctctgcctc caagtctggc acctcagcct ccctggccat cactgggctc      240
caggctgacg atgaggctga ttattactgc cagtcctatg acagcagcct gagtggttcg      300
gttttcggcg gagggaccaa ggtcacctgc ctaggtgcg                                339
```

<210> 77

<211> 113

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> Ab8

<400> 77

Gln Ala Val Leu Thr Gln Pro Ser Ser Val Ser Gly Ala Pro Gly Gln
5 10 15

Arg Val Thr Ile Ser Cys Thr Gly Ser Gly Ser Asn Ile Gly Ala Pro
20 25 30

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

Leu Ile Tyr His Asn Asn Lys Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe
50 55 60

Ser Ala Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Ser Leu Ala Ile Thr Gly Leu
65 70 75 80

Gln Ala Asp Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Ser Tyr Asp Ser Ser
85 90 95

Leu Ser Gly Ser Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Thr Val Leu Gly
100 105 110

Ala

<210> 78

<211> 14

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> Ab8

<400> 78

Thr Gly Ser Gly Ser Asn Ile Gly Ala Pro Tyr Asp Val Ser
5 10

<210> 79

<211> 7

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> Ab8

<400> 79

His Asn Asn Lys Arg Pro Ser

5

<210> 80

<211> 11

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> Ab8

<400> 80

Gln Ser Tyr Asp Ser Ser Leu Ser Gly Ser Val

5

10

<210> 81

<211> 360

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<220>

<223> Ab9

<400> 81

cagggtgcagc tgggtcaatc tggggctgag gtgaagaagc ctggggcctc agtgaaggtc 60
 tcatgtaaaa tttccggaca cagcctcagt gaactgtcca tccactgggt gcgacagact 120
 cccacaaaag gatttgagtg gatgggagga tttgatcctg aagagaatga aatagtctac 180
 gcacagaggt tccagggcag agtcaccatg accgaggaca catctataga cacggcctac 240
 ctgaccctga gcagcctgag atccgacgac acggccgttt attattgtgc aatagtgggg 300
 tctttcagtc cggtcacgta cggcctctgg ggccaagga caatggtcac cgtctcgagt 360

<210> 82

<211> 120

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> Ab9

<400> 82

Gln	Val	Gln	Leu	Val	Gln	Ser	Gly	Ala	Glu	Val	Lys	Lys	Pro	Gly	Ala
			5						10					15	
Ser	Val	Lys	Val	Ser	Cys	Lys	Ile	Ser	Gly	His	Ser	Leu	Ser	Glu	Leu
			20					25					30		
Ser	Ile	His	Trp	Val	Arg	Gln	Thr	Pro	Thr	Lys	Gly	Phe	Glu	Trp	Met
		35					40						45		

Gly Gly Phe Asp Pro Glu Glu Asn Glu Ile Val Tyr Ala Gln Arg Phe
 50 55 60

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

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

Ala Ile Val Gly Ser Phe Ser Pro Val Thr Tyr Gly Leu Trp Gly Gln
 100 105 110

Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 83

<211> 5

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> Ab9

<400> 83

Glu Leu Ser Ile His

5

<210> 84

<211> 17

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> Ab9

<400> 84

Gly Phe Asp Pro Glu Glu Asn Glu Ile Val Tyr Ala Gln Arg Phe Gln
5 10 15

Gly

<210> 85

<211> 11

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> Ab9

<400> 85

Val Gly Ser Phe Ser Pro Val Thr Tyr Gly Leu
5 10

<210> 86

<211> 339

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<220>

<223> Ab9

<400> 86

caggctgtgc tgactcagcc gtcctcagtg tctggggccc cagggcagag ggtcaccatc 60
 tcctgtactg ggagcggctc caacatcggg gcaccttatg atgtaagctg gtaccagcag 120
 cttccaggaa cagcccccaa actcctcatc taticataaca acaagcggcc ctcaggggtc 180
 cctgaccgat tctctgcctc caagtctggc acctcagcct ccctggccat cactgggctc 240
 caggctgacg atgaggctga ttattactgc cagtcctatg acagcagcct gagtggttcg 300
 gttttcggcg gagggaccaa ggtcaccgtc ctaggtgcg 339

<210> 87

<211> 113

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> Ab9

<400> 87

Gln Ala Val Leu Thr Gln Pro Ser Ser Val Ser Gly Ala Pro Gly Gln
 5 10 15

Arg Val Thr Ile Ser Cys Thr Gly Ser Gly Ser Asn Ile Gly Ala Pro

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

Ala

<210> 88

<211> 14

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> Ab9

<400> 88

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

5

10

<210> 89

<211> 7

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> Ab9

<400> 89

His Asn Asn Lys Arg Pro Ser

5

<210> 90

<211> 11

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> Ab9

<400> 90

Gln Ser Tyr Asp Ser Ser Leu Ser Gly Ser Val

5

10

<210> 91

<211> 360

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<220>

<223> Ab10

<400> 91

cagggtgcagc tgggtgcaatc tggggctgag gtgaagaagc ctggggcctc agtgaaggtc 60
 tcatgtaaaa tttccggaca cagcctcagt gaactgtcca tccactgggt gcgacagact 120
 cccacaaaag gatttgagtg gatgggagga tttgatcctg aagagaatga aatagtctac 180
 gcacagaggt tccagggcag agtcacatg accgaggaca catctataga cacggcctac 240
 ctgaccctga gcagcctgag atccgacgac acggccgttt attattgtgc aatagtgggg 300
 tctttcagtg gcctcgcgta caggccctgg ggcaaagga caatggtcac catctcgagt 360

<210> 92

<211> 120

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> Ab10

<400> 92

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
 5 10 15
 Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ile Ser Gly His Ser Leu Ser Glu Leu
 20 25 30

 Ser Ile His Trp Val Arg Gln Thr Pro Thr Lys Gly Phe Glu Trp Met
 35 40 45

 Gly Gly Phe Asp Pro Glu Glu Asn Glu Ile Val Tyr Ala Gln Arg Phe
 50 55 60

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

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

Ala Ile Val Gly Ser Phe Ser Gly Leu Ala Tyr Arg Pro Trp Gly Lys
100 105 110

Gly Thr Met Val Thr Ile Ser Ser
115 120

<210> 93

<211> 5

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> Ab10

<400> 93

Glu Leu Ser Ile His
5

<210> 94

<211> 17

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> Ab10

<400> 94

Gly Phe Asp Pro Glu Glu Asn Glu Ile Val Tyr Ala Gln Arg Phe Gln
5 10 15

Gly

<210> 95

<211> 11

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> Ab10

<400> 95

Val Gly Ser Phe Ser Gly Leu Ala Tyr Arg Pro
5 10

<210> 96

<211> 339

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<220>

<223> Ab10

<400> 96

caggctgtgc tgactcagcc gtcctcagtg tctggggccc cagggcagag ggtcaccatc 60
 tcctgtactg ggagcggctc caacatcggg gcaccttatg atgtaagctg gtaccagcag 120
 cttccaggaa cagcccccaa actcctcatc taticataaca acaagcggcc ctcaggggtc 180
 cctgaccgat tctctgcctc caagtctggc acctcagcct ccctggccat cactgggctc 240
 caggctgacg atgaggctga ttattactgc cagtcctatg acagcagcct gagtggttcg 300
 gtttctggcg gagggaccaa ggtcaccgtc ctaggtgcg 339

<210> 97

<211> 113

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> Ab10

<400> 97

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

Ser Ala Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Ser Leu Ala Ile Thr Gly Leu
65 70 75 80

Gln Ala Asp Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Ser Tyr Asp Ser Ser
85 90 95

Leu Ser Gly Ser Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Thr Val Leu Gly
100 105 110

Ala

<210> 98

<211> 14

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> Ab10

<400> 98

Thr Gly Ser Gly Ser Asn Ile Gly Ala Pro Tyr Asp Val Ser
5 10

<210> 99

<211> 7

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> Ab10

<400> 99

His Asn Asn Lys Arg Pro Ser
5

<210> 100
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<220>
 <223> Ab10

<400> 100
Gln Ser Tyr Asp Ser Ser Leu Ser Gly Ser Val
 5 10

<210> 101
 <211> 360
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

<220>
 <223> Ab11

<400> 101
cagggtgcagc tggtgcaatc tggcgctgag gtgaagaagc ctgaggcctc agtgaaggtc 60
tcatgtaaaa ttccgggaca cagcctcagt gaactgtcca tccactgggt gcgacagact 120
cccacaaaag gatttgagtg gatgggagga tttgatcctg aagagaatga aatagtctac 180
gcacagaggt tccagggcag agtcaccatg accgaggaca catctataga cacggcctac 240
ctgaccctga gcagcctgag atccgacgac acggccgttt attattgtgc aatagtgggg 300
tctttcagtc cgatcacgta cggcctctgg ggcaaagga caatggtcac cgtctcgagt 360

<210> 102
 <211> 120

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> Ab11

<400> 102

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

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ile Pro Gly His Ser Leu Ser Glu Leu
20 25 30

Ser Ile His Trp Val Arg Gln Thr Pro Thr Lys Gly Phe Glu Trp Met
35 40 45

Gly Gly Phe Asp Pro Glu Glu Asn Glu Ile Val Tyr Ala Gln Arg Phe
50 55 60

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

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

Ala Ile Val Gly Ser Phe Ser Pro Ile Thr Tyr Gly Leu Trp Gly Lys
100 105 110

Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 103

<211> 5

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> Ab11

<400> 103

Glu Leu Ser Ile His

5

<210> 104

<211> 17

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> Ab11

<400> 104

Gly Phe Asp Pro Glu Glu Asn Glu Ile Val Tyr Ala Gln Arg Phe Gln

5

10

15

Gly

<210> 105

<211> 11

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> Ab11

<400> 105

Val Gly Ser Phe Ser Pro Ile Thr Tyr Gly Leu

5

10

<210> 106

<211> 339

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<220>

<223> Ab11

<400> 106

caggctgtgc tgactcagcc gtcctcagtg tctgggggtcc cagggcagag ggtcaccatc 60

tcctgtactg ggagcggctc caacatcggg gcaccttatg atgtaagctg gtaccagcag 120

cttcaggaa cagccccaa actcctcatc tatkataaca acaagcggcc ctcaggggtc 180

cctgaccgat tctctgcctc caagtctggc acctcagcct ccctggccat cactgggctc 240

caggctgacg atgaggctga ttattactgc cagtcctatg acagcagcct gagtggttcg 300

gttttcggcg gagggaccaa ggtcaccgtc ctaggtgcg 339

<210> 107

<211> 113

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> Ab11

<400> 107

Gln Ala Val Leu Thr Gln Pro Ser Ser Val Ser Gly Val Pro Gly Gln
 5 10 15

Arg Val Thr Ile Ser Cys Thr Gly Ser Gly Ser Asn Ile Gly Ala Pro
 20 25 30

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

Leu Ile Tyr His Asn Asn Lys Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe
 50 55 60

Ser Ala Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Ser Leu Ala Ile Thr Gly Leu
 65 70 75 80

Gln Ala Asp Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Ser Tyr Asp Ser Ser
 85 90 95

Leu Ser Gly Ser Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Thr Val Leu Gly
 100 105 110

Ala

<210> 108

<211> 14

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> Ab11

<400> 108

Thr Gly Ser Gly Ser Asn Ile Gly Ala Pro Tyr Asp Val Ser
 5 10

<210> 109

<211> 7

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> Ab11

<400> 109

His Asn Asn Lys Arg Pro Ser

5

<210> 110

<211> 11

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> Ab11

<400> 110

Gln Ser Tyr Asp Ser Ser Leu Ser Gly Ser Val

5

10

<210> 111

<211> 360

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<220>

<223> Ab12

<400> 111

cagggtgcagc tgggtgcaatc tggggctgag gtgaagaagc ctggggcctc agtgaaggtc 60
 tcatgtaaaa tttccggaca cagcctcagt gaactgtcca tccactgggt gcgacagact 120
 cccacaaaag gatttgagtg gatgggagga tttgatcctg aagagaatga aatagtctac 180
 gcacagaggt tccagggcag agtcacatg accgaggaca catctataga cacggcctac 240
 ctgaccctga gcagcctgag atccgacgac acggccgttt attattgttc aatagtgggg 300
 tctttcagtg gctgggcctt tgactactgg ggcaaagga caatggtcac cgtctcgagt 360

<210> 112

<211> 120

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> Ab12

<400> 112

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

Gly Phe Asp Pro Glu Glu Asn Glu Ile Val Tyr Ala Gln Arg Phe Gln
5 10 15

Gly

<210> 115

<211> 11

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> Ab12

<400> 115

val Gly Ser Phe Ser Gly Trp Ala Phe Asp Tyr
5 10

<210> 116

<211> 339

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<220>

<223> Ab12

<400> 116

caggctgtgc tgactcagcc gtcctcagtg tctggggccc cagggcagag ggtcaccatc 60
 tcctgtactg ggagcggctc caacatcggg gcaccttatg atgtaagctg gtaccagcag 120
 cttccaggaa cagccccaa actcctcatc tatcataaca acaagcggcc ctcagggggtc 180
 cctgaccgat tctctgcctc caagtctggc acctcagcct ccctggccat cactggggtc 240
 caggctgacg atgaggctga ttattactgc cagtcctatg acagcgagcc gaccgagatc 300
 cgcttcgggg gagggaccaa gctcaccgtc ctaggtgcg 339

<210> 117

<211> 113

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> Ab12

<400> 117

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

Ser Ala Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Ser Leu Ala Ile Thr Gly Leu
 65 70 75 80

Gln Ala Asp Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Ser Tyr Asp Ser Glu
 85 90 95

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

Ala

<210> 118

<211> 14

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> Ab12

<400> 118

Thr Gly Ser Gly Ser Asn Ile Gly Ala Pro Tyr Asp Val Ser
 5 10

<210> 119

<211> 7

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> Ab12

<400> 119

His Asn Asn Lys Arg Pro Ser
 5

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> Ab13

<400> 122

```

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

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ile Ser Gly His Ser Leu Ser Glu Leu
          20              25              30

Ser Ile His Trp Val Arg Gln Thr Pro Thr Lys Gly Phe Glu Trp Met
          35              40              45

Gly Gly Phe Asp Pro Glu Glu Asn Glu Ile Val Tyr Ala Gln Arg Phe
          50              55              60

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

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

Ser Ile Val Gly Ser Phe Ser Gly Trp Ala Phe Asp Tyr Trp Gly Lys
          100             105             110

Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser
          115             120

```

<210> 123

<211> 5

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> Ab13

<400> 123

Glu Leu Ser Ile His

5

<210> 124

<211> 17

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> Ab13

<400> 124

Gly Phe Asp Pro Glu Glu Asn Glu Ile Val Tyr Ala Gln Arg Phe Gln

5

10

15

<210> 125

<211> 11

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> Ab13

<400> 125

Val Gly Ser Phe Ser Gly Trp Ala Phe Asp Tyr

5

10

<210> 126

<211> 339

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<220>

<223> Ab13

<400> 126

caggctgtgc tgactcagcc gtcctcagtg tctggggccc cagggcagag ggtcaccatc	60
tcctgtactg ggagcggctc caacatcggg gcaccttatg atgtaagctg gtaccagcag	120
cttccaggaa cagcccccaa actcctcatc tatkataaca acaagcggcc ctcaggggtc	180
cctgaccgat tctctgcctc caagtctggc acctcagcct ccctggccat cactgggctc	240
caggctgacg atgaggctga ttattactgc cagtcctatg acagcaggac gggcatcatc	300
gtcttcgggg gagggaccaa ggtcacctgc ctaggtgcg	339

<210> 127

<211> 113

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> Ab13

<400> 127

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

Leu Ile Tyr His Asn Asn Lys Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe
 50 55 60

Ser Ala Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Ser Leu Ala Ile Thr Gly Leu
 65 70 75 80

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

Thr Gly Ile Ile Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Thr Val Leu Gly
 100 105 110

Ala

<210> 128

<211> 14

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> Ab13

<400> 128

Thr Gly Ser Gly Ser Asn Ile Gly Ala Pro Tyr Asp Val Ser
 5 10

<210> 129

<211> 7

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> Ab13

<400> 129

His Asn Asn Lys Arg Pro Ser

5

<210> 130

<211> 11

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> Ab13

<400> 130

Gln Ser Tyr Asp Ser Arg Thr Gly Ile Ile Val

5

10

<210> 131

<211> 360

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<220>

<223> Ab14

<400> 131

cagggtgcagc tgggtgcaatc tggggctgag gtgaagaagc ctggggcctc agtgaaggtc 60

tcatgtaaaa tttccggaca cagcctcagt gaactgtcca tccactgggt gcgacagact 120

cccacaaaag gatttgagtg gatgggagga ttgatcctg aagagaatga aatagtctac 180

gcacagaggt tccagggcag agtcaccatg accgaggaca catctataga cacggcctac 240

ctgaccctga gcagcctgag atccgacgac acggccgttt attattgttc aatattgggg 300

agcgtgaccg cctgggcctt tgactactgg ggcaaagga caatggtcac cgtctcgagt 360

<210> 132

<211> 120

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> Ab14

<400> 132

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

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ile Ser Gly His Ser Leu Ser Glu Leu
 20 25 30

Ser Ile His Trp Val Arg Gln Thr Pro Thr Lys Gly Phe Glu Trp Met
 35 40 45

Gly Gly Phe Asp Pro Glu Glu Asn Glu Ile Val Tyr Ala Gln Arg Phe
 50 55 60

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

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

Ser Ile Leu Gly Ser Val Thr Ala Trp Ala Phe Asp Tyr Trp Gly Lys
 100 105 110

Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 133

<211> 5
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<220>
 <223> Ab14

<400> 133
Glu Leu Ser Ile His
 5

<210> 134
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<220>
 <223> Ab14

<400> 134
Gly Phe Asp Pro Glu Glu Asn Glu Ile Val Tyr Ala Gln Arg Phe Gln
 5 10 15

Gly

<210> 135
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<220>
 <223> Ab14

<400> 135

Leu Gly Ser Val Thr Ala Trp Ala Phe Asp Tyr

5

10

<210> 136

<211> 339

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<220>

<223> Ab14

<400> 136

caggctgtgc tgactcagcc gtcctcagtg tctggggccc cagggcagag ggtcaccatc 60

tcctgtactg ggagcggctc caacatcggg gcaccttatg atgtaagctg gtaccagcag 120

cttccaggaa cagcccccaa actcctcatc tatkataaca acaagcggcc ctcaggggctc 180

cctgaccgat tctctgcctc caagtctggc acctcagcct ccctggccat cactgggctc 240

caggctgacg atgaggctga ttattactgc cagtcctatg acagcgagga caggatgacg 300

gagttcgggg gagggaccaa ggtcaccgtc ctaggtgcg 339

<210> 137

<211> 113

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> Ab14

<400> 137

Gln Ala Val Leu Thr Gln Pro Ser Ser Val Ser Gly Ala Pro Gly Gln
5 10 15

Arg Val Thr Ile Ser Cys Thr Gly Ser Gly Ser Asn Ile Gly Ala Pro
20 25 30

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

Leu Ile Tyr His Asn Asn Lys Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe
50 55 60

Ser Ala Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Ser Leu Ala Ile Thr Gly Leu
65 70 75 80

Gln Ala Asp Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Ser Tyr Asp Ser Glu
85 90 95

Asp Arg Met Thr Glu Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Thr Val Leu Gly
100 105 110

Ala

- <210> 138
- <211> 14
- <212> PRT
- <213> Homo sapiens

- <220>
- <223> Ab14

- <400> 138

Thr Gly Ser Gly Ser Asn Ile Gly Ala Pro Tyr Asp Val Ser
5 10

<210> 139

<211> 7

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> Ab14

<400> 139

His Asn Asn Lys Arg Pro Ser

5

<210> 140

<211> 11

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> Ab14

<400> 140

Gln Ser Tyr Asp Ser Glu Asp Arg Met Thr Glu

5

10

<210> 141

<211> 360

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<220>

<223> Ab15

<400> 141

Gly Gly Phe Asp Pro Glu Glu Asn Glu Ile Val Tyr Ala Gln Arg Phe
 50 55 60

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

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

Ser Ile Ala Gly Ser Ile Pro Gly Trp Ala Phe Asp Tyr Trp Gly Lys
 100 105 110

Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 143

<211> 5

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> Ab15

<400> 143

Glu Leu Ser Ile His

5

<210> 144

<211> 17

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> Ab15

<400> 144

Gly Phe Asp Pro Glu Glu Asn Glu Ile Val Tyr Ala Gln Arg Phe Gln

5

10

15

Gly

<210> 145

<211> 11

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> Ab15

<400> 145

Ala Gly Ser Ile Pro Gly Trp Ala Phe Asp Tyr

5

10

<210> 146

<211> 339

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<220>

<223> Ab15

<400> 146

Gln Ala Asp Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Ser Tyr Asp Ser Gln
85 90 95

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

Ala

<210> 148

<211> 14

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> Ab15

<400> 148

Thr Gly Ser Gly Ser Asn Ile Gly Ala Pro Tyr Asp Val Ser
5 10

<210> 149

<211> 7

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> Ab15

<400> 149

His Asn Asn Lys Arg Pro Ser
5

<210> 150

<211> 11

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> Ab15

<400> 150

Gln Ser Tyr Asp Ser Gln Leu Ile Ser Ala Ala

5

10

<210> 151

<211> 360

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<220>

<223> Ab16

<400> 151

cagg tg cagc tgg tg caatc tgg g gctgag gtg a agaagc ctg g g g cctc agt g aaggtc	60
tcat g taaaa ttt cc ggaca cag c ctcagt gaa ct gtcca tcc act gggt g cg acagact	120
ccc ac aaaag gatt t gagtg gat g ggagga ttt gat ctctg aag ag aatga aat ag tctac	180
gc ac agaggt tcc ag ggcag ag t caccatg acc g aggaca cat ct ataga cac g gcctac	240
ctg ac cctga gc ag cctgag at cc gacgac ac g gccgttt att at tgttc aat ag tgggg	300
tct tt cagtc cg tt gaccat gg g cctctgg gg caa agggga ca at ggtcac cgt ct cgagt	360

<210> 152

<211> 120

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> Ab16

<400> 152

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

5

10

15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ile Ser Gly His Ser Leu Ser Glu Leu

20

25

30

Ser Ile His Trp Val Arg Gln Thr Pro Thr Lys Gly Phe Glu Trp Met

35

40

45

Gly Gly Phe Asp Pro Glu Glu Asn Glu Ile Val Tyr Ala Gln Arg Phe

50

55

60

Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Glu Asp Thr Ser Ile Asp Thr Ala Tyr

65

70

75

80

Leu Thr Leu Ser Ser Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys

85

90

95

Ser Ile Val Gly Ser Phe Ser Pro Leu Thr Met Gly Leu Trp Gly Lys

100

105

110

Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser

115

120

<210> 153

<211> 5

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> Ab16

<400> 153

Glu Leu Ser Ile His

5

<210> 154

<211> 17

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> Ab16

<400> 154

Gly Phe Asp Pro Glu Glu Asn Glu Ile Val Tyr Ala Gln Arg Phe Gln

5

10

15

Gly

<210> 155

<211> 11

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> Ab16

<400> 155

Val Gly Ser Phe Ser Pro Leu Thr Met Gly Leu

5

10

<210> 156

<211> 339

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<220>

<223> Ab16

<400> 156

caggctgtgc tgactcagcc gtcctcagtg tctggggccc cagggcagag ggtcaccatc	60
tcctgtactg ggagcggctc caacatcggg gcaccttatg atgtaagctg gtaccagcag	120
cttccaggaa cagcccccaa actcctcatc tatcataaca acaagcggcc ctcaggggtc	180
cctgaccgat tctctgcctc caagtctggc acctcagcct ccctggccat cactgggctc	240
caggctgagg atgaggctga ttattactgc gcgacctccg acgagatcct gagtggttcg	300
gttttcgggg gagggaccaa ggtcacctgc ctaggtgcg	339

<210> 157

<211> 113

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> Ab16

<400> 157

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

Leu Ile Tyr His Asn Asn Lys Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe
 50 55 60

Ser Ala Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Ser Leu Ala Ile Thr Gly Leu
 65 70 75 80

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

Leu Ser Gly Ser Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Thr Val Leu Gly
 100 105 110

Ala

<210> 158

<211> 14

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> Ab16

<400> 158

Thr Gly Ser Gly Ser Asn Ile Gly Ala Pro Tyr Asp Val Ser
 5 10

<210> 159

<211> 7

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> Ab16

<400> 159

His Asn Asn Lys Arg Pro Ser

5

<210> 160

<211> 11

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> Ab16

<400> 160

Ala Thr Ser Asp Glu Ile Leu Ser Gly Ser Val

5

10

<210> 161

<211> 360

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<220>

<223> Ab17

<400> 161

caggtgcagc tggtgcaatc tggggctgag'gtgaagaagc ctggggcctc agtgaaggtc 60

tcatgtaaaa tttccggaca cagcctcagt gaactgtcca tccactgggt gcgacagact 120

cccacaaaag gatttgagtg gatgggagga tttgatcctg aagagaatga aatagtctac 180

gcacagaggt tccagggcag agtcaccatg accgaggaca catctataga cacggcctac 240

ctgaccctga gcagcctgag atccgacgac acggccgttt attattgttc aatagtgggg 300

tctttcagtc ccctgacgat ggggttgtgg ggcaaagga caatggtcac cgtctcgagt 360

<210> 162

<211> 120

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> Ab17

<400> 162

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

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ile Ser Gly His Ser Leu Ser Glu Leu
 20 25 30

Ser Ile His Trp Val Arg Gln Thr Pro Thr Lys Gly Phe Glu Trp Met
 35 40 45

Gly Gly Phe Asp Pro Glu Glu Asn Glu Ile Val Tyr Ala Gln Arg Phe
 50 55 60

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

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

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

Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 163

<211> 5

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> Ab17

<400> 163

Glu Leu Ser Ile His

5

<210> 164

<211> 17

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> Ab17

<400> 164

Gly Phe Asp Pro Glu Glu Asn Glu Ile Val Tyr Ala Gln Arg Phe Gln

5

10

15

Gly

<210> 165

<211> 11

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> Ab17

<400> 165

Val Gly Ser Phe Ser Pro Leu Thr Met Gly Leu

5

10

<210> 166
 <211> 339
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

<220>
 <223> Ab17

<400> 166
 caggctgtgc tgactcagcc gtcctcagtg tctggggccc cagggcagag ggtcaccatc 60
 tcctgtactg ggagcggctc caacatcggg gcaccttatg atgtaagctg gtaccagcag 120
 cttccaggaa cagcccccaa actcctcatc tatcataaca acaagcggcc ctcaggggctc 180
 cctgaccgat tctctgcctc caagtctggc acctcagcct ccctggccat cactgggctc 240
 caggctgacg atgaggctga ttattactgc gcgaccgtcg aggacggcct gagtggttcg 300
 gttttcgggg gagggaccaa ggtcaccgtc ctaggtgcg 339

<210> 167
 <211> 113
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<220>
 <223> Ab17

<400> 167

<210> 169

<211> 7

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> Ab17

<400> 169

His Asn Asn Lys Arg Pro Ser

5

<210> 170

<211> 11

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> Ab17

<400> 170

Ala Thr Val Glu Asp Gly Leu Ser Gly Ser Val

5

10

<210> 171

<211> 360

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<220>

<223> Ab18

<400> 171

cagggtgcagc tgggtgcaatc tggggctgag gtgaagaagc ctggggcctc agtgaaggtc 60
 tcacgtataaa tttccggaca cagcctcagt gaactgttca tccactgggt gcgacagact 120
 cccacaaaag gatttgagtg gatgggagga tttgatcctg aagagaatga aatagtctac 180
 gcacagaggt tccagggcag agtcaccatg accgaggaca catctataga cacggcctac 240
 ctgaccctga gcagcctgag atccgacgac acggccgttt attattgttc aacagtgggg 300
 tctttcagtg ggcccgcctt tcacctctgg ggcaaagga caatggtcac cgtctcgagt 360

<210> 172

<211> 120

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> Ab18

<400> 172

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

ctcttcgggg gagggaccaa ggtcaccgtc ctaggtgcg

339

<210> 177

<211> 113

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> Ab18

<400> 177

Gln Ala Val Leu Thr Gln Pro Ser Ser Val Ser Gly Ala Pro Gly Gln
 5 10 15

Arg Val Thr Ile Ser Cys Thr Gly Ser Gly Ser Asn Ile Gly Ala Pro
 20 25 30

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

Leu Ile Tyr His Asn Asn Lys Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe
 50 55 60

Ser Ala Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Ser Leu Ala Ile Thr Gly Leu
 65 70 75 80

Gln Ala Asp Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Ser Tyr Asp Ser Gln
 85 90 95

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

Ala

Gln Ser Tyr Asp Ser Gln Trp Asn Gln Pro Leu

5

10

<210> 181

<211> 360

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<220>

<223> Ab19

<400> 181

cagggtgcagc tgggtgcaatc tggggctgag gtgaagaagc ctggggcctc agtgaaggtc 60

tcatgtaaaa tttccggaca cagcctcagt gaactgtcca tccactgggt gcgacagact 120

cccacaaaag gatttgagtg gatgggagga tttgatcctg aagagaatga aatagtctac 180

gcacagaggt tccagggcag agtcaccatg accgaggaca catctataga cacggcctac 240

ctgaccctga gcagcctgag atccgacgac acggccgttt attattgtgc aatagtgggg 300

tctgtcagtc gcatcacgta cggcttctgg ggcaaagga caatggtcac cgtctcgagt 360

<210> 182

<211> 120

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> Ab19

<400> 182

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

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ile Ser Gly His Ser Leu Ser Glu Leu
 20 25 30

Ser Ile His Trp Val Arg Gln Thr Pro Thr Lys Gly Phe Glu Trp Met
 35 40 45

Gly Gly Phe Asp Pro Glu Glu Asn Glu Ile Val Tyr Ala Gln Arg Phe
 50 55 60

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

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

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

Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 183

<211> 5

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> Ab19

<400> 183

Glu Leu Ser Ile His

5

<210> 184
<211> 17
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> Ab19

<400> 184
Gly Phe Asp Pro Glu Glu Asn Glu Ile Val Tyr Ala Gln Arg Phe Gln
 5 10 15

Gly

<210> 185
<211> 11
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> Ab19

<400> 185
Val Gly Ser Val Ser Arg Ile Thr Tyr Gly Phe
 5 10

<210> 186
<211> 339
<212> ADN
<213> Homo sapiens

<220>
<223> Ab19
<400> 186

<213> Homo sapiens

<220>

<223> Ab19

<400> 190

Gln Ser Tyr Asp Ser Arg Asn Pro His Val Ile

5

10

<210> 191

<211> 360

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<220>

<223> Ab20

<400> 191

cagggtgcagc tggtgcaatc tggggctgag gtgaagaagc ctggggcctc agtgaaggtc 60

tcatgtaaaa tttccggaca cagcctcagt gaactgtcca tccactgggt gcgacagact 120

cccacaaaag gatttgagtg gatgggagga tttgatcctg aagagaatga aatagtctac 180

gcacagaggt tccagggcag agtcaccatg accgaggaca catctataga cacggcctac 240

ctgaccctga gcagcctgag atccgacgac acggccgttt attattgttc aatagtgggg 300

tctttcagtc ccctgacgct gggcctctgg ggcaaagga caatggtcac cgtctcgagt 360

<210> 192

<211> 120

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 193

Glu Leu Ser Ile His

5

<210> 194

<211> 17

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> Ab20

<400> 194

Gly Phe Asp Pro Glu Glu Asn Glu Ile Val Tyr Ala Gln Arg Phe Gln

5

10

15

Gly

<210> 195

<211> 11

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> Ab20

<400> 195

Val Gly Ser Phe Ser Pro Leu Thr Leu Gly Leu

5

10

<210> 196

<211> 339

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<220>

<223> Ab20

<400> 196

caggctgtgc tgactcagcc gtcctcagtg tctggggccc cagggcagag ggtcaccatc 60
tcctgtactg ggagcggctc caacatcggg gcaccttatg atgtaagctg gtaccagcag 120
cttccaggaa cagcccccaa actcctcatc tatcataaca acaagcggcc ctcaggggtc 180
cctgaccgat tctctgcctc caagtctggc acctcagcct ccctggccat cactgggctc 240
caggctgacg atgaggctga ttattactgc gcgaccgtgg acgagggcct gagtggttcg 300
gttttcggcg gagggaccaa ggtcaccgtc ctaagtgcg 339

<210> 197

<211> 113

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> Ab20

<400> 197

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

Leu Ile Tyr His Asn Asn Lys Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe
 50 55 60

Ser Ala Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Ser Leu Ala Ile Thr Gly Leu
 65 70 75 80

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

Leu Ser Gly Ser Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Thr Val Leu Ser
 100 105 110

Ala

<210> 198

<211> 14

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> Ab20

<400> 198

Thr Gly Ser Gly Ser Asn Ile Gly Ala Pro Tyr Asp Val Ser
 5 10

<210> 199

<211> 7

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> Ab20

<400> 199

His Asn Asn Lys Arg Pro Ser

5

<210> 200

<211> 11

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> Ab20

<400> 200

Ala Thr Val Asp Glu Ala Leu Ser Gly Ser Val

5

10

<210> 201

<211> 5

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 201

Tyr Leu Asp Phe Gln

5

<210> 202

<211> 385

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 202

Met Leu Leu Leu Val Thr Ser Leu Leu Leu Cys Glu Leu Pro His Pro
 1 5 10 15

Ala Phe Leu Leu Ile Pro Glu Lys Ser Asp Leu Arg Thr Val Ala Pro
 20 25 30

Ala Ser Ser Leu Asn Val Arg Phe Asp Ser Arg Thr Met Asn Leu Ser
 35 40 45

Trp Asp Cys Gln Glu Asn Thr Thr Phe Ser Lys Cys Phe Leu Thr Asp
 50 55 60

Lys Lys Asn Arg Val Val Glu Pro Arg Leu Ser Asn Asn Glu Cys Ser
 65 70 75 80

Cys Thr Phe Arg Glu Ile Cys Leu His Glu Gly Val Thr Phe Glu Val
 85 90 95

His Val Asn Thr Ser Gln Arg Gly Phe Gln Gln Lys Leu Leu Tyr Pro
 100 105 110

Asn Ser Gly Arg Glu Gly Thr Ala Ala Gln Asn Phe Ser Cys Phe Ile
 115 120 125

Tyr Asn Ala Asp Leu Met Asn Cys Thr Trp Ala Arg Gly Pro Thr Ala
 130 135 140

Pro Arg Asp Val Gln Tyr Phe Leu Tyr Ile Arg Asn Ser Lys Arg Arg
 145 150 155 160

Arg Glu Ile Arg Cys Pro Tyr Tyr Ile Gln Asp Ser Gly Thr His Val
 165 170 175

Gly Cys His Leu Asp Asn Leu Ser Gly Leu Thr Ser Arg Asn Tyr Phe
 180 185 190

Leu Val Asn Gly Thr Ser Arg Glu Ile Gly Ile Gln Phe Phe Asp Ser
 195 200 205

Leu Leu Asp Thr Lys Lys Ile Glu Arg Phe Asn Pro Pro Ser Asn Val
 210 215 220

Thr Val Arg Cys Asn Thr Thr His Cys Leu Val Arg Trp Lys Gln Pro
 225 230 235 240

Arg Thr Tyr Gln Lys Leu Ser Tyr Leu Asp Phe Gln Tyr Gln Leu Asp
 245 250 255

Val His Arg Lys Asn Thr Gln Pro Gly Thr Glu Asn Leu Leu Ile Asn
 260 265 270

Val Ser Gly Asp Leu Glu Asn Arg Tyr Asn Phe Pro Ser Ser Glu Pro
 275 280 285

Arg Ala Lys His Ser Val Lys Ile Arg Ala Ala Asp Val Arg Ile Leu
 290 295 300

Asn Trp Ser Ser Trp Ser Glu Ala Ile Glu Phe Gly Ser Asp Asp Gly
 305 310 315 320

Asn Leu Gly Ser Val Tyr Ile Tyr Val Leu Leu Ile Val Gly Thr Leu
 325 330 335

Val Cys Gly Ile Val Leu Gly Phe Leu Phe Lys Arg Phe Leu Arg Ile
 340 345 350

Gln Arg Leu Phe Pro Pro Val Pro Gln Ile Lys Asp Lys Leu Asn Asp
 355 360 365

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

Glu
 385

<210> 203

<211> 316

<212> PRT

<213> Homo Sapiens

<220>

<223> Humano sequência com FLAG etiqueta

<400> 203

Ala Ser Ile Ser Ala Arg Gln Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Asp Lys Thr
 1 5 10 15

Arg Gln Glu Lys Ser Asp Leu Arg Thr Val Ala Pro Ala Ser Ser Leu
 20 25 30

Asn Val Arg Phe Asp Ser Arg Thr Met Asn Leu Ser Trp Asp Cys Gln
 35 40 45

Glu Asn Thr Thr Phe Ser Lys Cys Phe Leu Thr Asp Lys Lys Asn Arg
 50 55 60

Val Val Glu Pro Arg Leu Ser Asn Asn Glu Cys Ser Cys Thr Phe Arg
 65 70 75 80

Glu Ile Cys Leu His Glu Gly Val Thr Phe Glu Val His Val Asn Thr
 85 90 95

Ser Gln Arg Gly Phe Gln Gln Lys Leu Leu Tyr Pro Asn Ser Gly Arg
 100 105 110

Glu Gly Thr Ala Ala Gln Asn Phe Ser Cys Phe Ile Tyr Asn Ala Asp
 115 120 125

Leu Met Asn Cys Thr Trp Ala Arg Gly Pro Thr Ala Pro Arg Asp Val
 130 135 140

Gln Tyr Phe Leu Tyr Ile Arg Asn Ser Lys Arg Arg Arg Glu Ile Arg
 145 150 155 160

Cys Pro Tyr Tyr Ile Gln Asp Ser Gly Thr His Val Gly Cys His Leu
 165 170 175

Asp Asn Leu Ser Gly Leu Thr Ser Arg Asn Tyr Phe Leu Val Asn Gly
 180 185 190

Thr Ser Arg Glu Ile Gly Ile Gln Phe Phe Asp Ser Leu Leu Asp Thr
 195 200 205

Lys Lys Ile Glu Arg Phe Asn Pro Pro Ser Asn Val Thr Val Arg Cys
 210 215 220

Asn Thr Thr His Cys Leu Val Arg Trp Lys Gln Pro Arg Thr Tyr Gln
 225 230 235 240

Lys Leu Ser Tyr Leu Asp Phe Gln Tyr Gln Leu Asp Val His Arg Lys
 245 250 255

Asn Thr Gln Pro Gly Thr Glu Asn Leu Leu Ile Asn Val Ser Gly Asp
 260 265 270

Leu Glu Asn Arg Tyr Asn Phe Pro Ser Ser Glu Pro Arg Ala Lys His
 275 280 285

Ser Val Lys Ile Arg Ala Ala Asp Val Arg Ile Leu Asn Trp Ser Ser
 290 295 300

Trp Ser Glu Ala Ile Glu Phe Gly Ser Asp Asp Gly
 305 310 315

<210> 204

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Sintético FLAG péptido

<400> 204

Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Asp Lys

1 5

<210> 205

<211> 298

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 205

Glu Lys Ser Asp Leu Arg Thr Val Ala Pro Ala Ser Ser Leu Asn Val

1 5 10 15

Arg Phe Asp Ser Arg Thr Met Asn Leu Ser Trp Asp Cys Gln Glu Asn

20 25 30

Thr Thr Phe Ser Lys Cys Phe Leu Thr Asp Lys Lys Asn Arg Val Val

35 40 45

Glu Pro Arg Leu Ser Asn Asn Glu Cys Ser Cys Thr Phe Arg Glu Ile
 50 55 60

Cys Leu His Glu Gly Val Thr Phe Glu Val His Val Asn Thr Ser Gln
 65 70 75 80

Arg Gly Phe Gln Gln Lys Leu Leu Tyr Pro Asn Ser Gly Arg Glu Gly
 85 90 95

Thr Ala Ala Gln Asn Phe Ser Cys Phe Ile Tyr Asn Ala Asp Leu Met
 100 105 110

Asn Cys Thr Trp Ala Arg Gly Pro Thr Ala Pro Arg Asp Val Gln Tyr
 115 120 125

Phe Leu Tyr Ile Arg Asn Ser Lys Arg Arg Arg Glu Ile Arg Cys Pro
 130 135 140

Tyr Tyr Ile Gln Asp Ser Gly Thr His Val Gly Cys His Leu Asp Asn
 145 150 155 160

Leu Ser Gly Leu Thr Ser Arg Asn Tyr Phe Leu Val Asn Gly Thr Ser
 165 170 175

Arg Glu Ile Gly Ile Gln Phe Phe Asp Ser Leu Leu Asp Thr Lys Lys
 180 185 190

Ile Glu Arg Phe Asn Pro Pro Ser Asn Val Thr Val Arg Cys Asn Thr
 195 200 205

Thr His Cys Leu Val Arg Trp Lys Gln Pro Arg Thr Tyr Gln Lys Leu
 210 215 220

Ser Tyr Leu Asp Phe Gln Tyr Gln Leu Asp Val His Arg Lys Asn Thr
 225 230 235 240

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

Asn Arg Tyr Asn Phe Pro Ser Ser Glu Pro Arg Ala Lys His Ser Val
 260 265 270

Lys Ile Arg Ala Ala Asp Val Arg Ile Leu Asn Trp Ser Ser Trp Ser
 275 280 285

Glu Ala Ile Glu Phe Gly Ser Asp Asp Gly
 290 295

<210> 206

<211> 378

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 206

Glu Lys Ser Asp Leu Arg Thr Val Ala Pro Ala Ser Ser Leu Asn Val
 1 5 10 15

Arg Phe Asp Ser Arg Thr Met Asn Leu Ser Trp Asp Cys Gln Glu Asn
 20 25 30

Thr Thr Phe Ser Lys Cys Phe Leu Thr Asp Lys Lys Asn Arg Val Val
 35 40 45

Glu Pro Arg Leu Ser Asn Asn Glu Cys Ser Cys Thr Phe Arg Glu Ile
 50 55 60

Cys Leu His Glu Gly Val Thr Phe Glu Val His Val Asn Thr Ser Gln
 65 70 75 80

Arg Gly Phe Gln Gln Lys Leu Leu Tyr Pro Asn Ser Gly Arg Glu Gly
 85 90 95

Thr Ala Ala Gln Asn Phe Ser Cys Phe Ile Tyr Asn Ala Asp Leu Met
 100 105 110

Asn Cys Thr Trp Ala Arg Gly Pro Thr Ala Pro Arg Asp Val Gln Tyr
 115 120 125

Phe Leu Tyr Ile Arg Asn Ser Lys Arg Arg Arg Glu Ile Arg Cys Pro
 130 135 140

Tyr Tyr Ile Gln Asp Ser Gly Thr His Val Gly Cys His Leu Asp Asn
 145 150 155 160

Leu Ser Gly Leu Thr Ser Arg Asn Tyr Phe Leu Val Asn Gly Thr Ser
 165 170 175

Arg Glu Ile Gly Ile Gln Phe Phe Asp Ser Leu Leu Asp Thr Lys Lys
 180 185 190

Ile Glu Arg Phe Asn Pro Pro Ser Asn Val Thr Val Arg Cys Asn Thr
 195 200 205

Thr His Cys Leu Val Arg Trp Lys Gln Pro Arg Thr Tyr Gln Lys Leu
 210 215 220

Ser Tyr Leu Asp Phe Gln Tyr Gln Leu Asp Val His Arg Lys Asn Thr
 225 230 235 240

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

Asn Arg Tyr Asn Phe Pro Ser Ser Glu Pro Arg Ala Lys His Ser Val
 260 265 270

Lys Ile Arg Ala Ala Asp Val Arg Ile Leu Asn Trp Ser Ser Trp Ser
 275 280 285

Glu Ala Ile Glu Phe Gly Ser Asp Asp Gly Asn Leu Gly Ser Val Tyr
 290 295 300

Ile Tyr Val Leu Leu Ile Val Gly Thr Leu Val Cys Gly Ile Val Leu
 305 310 315 320

Gly Phe Leu Phe Lys Arg Phe Leu Arg Ile Gln Arg Leu Phe Pro Pro
 325 330 335

Val Pro Gln Ile Lys Asp Lys Leu Asn Asp Asn His Glu Val Glu Asp
 340 345 350

Glu Ile Ile Trp Glu Glu Phe Thr Pro Glu Glu Gly Lys Gly Tyr Arg
 355 360 365

Glu Glu Val Leu Thr Val Lys Glu Ile Thr
 370 375

<210> 207

<211> 333

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<220>

<223> Ab1

<400> 207

cagtctgtgc tgactcagcc gccctcagtg tctggggccc cagggcagag ggtcaccatc 60
 tcctgtactg ggagcggctc caacatcggg gcaccttatg atgtaagctg gtaccagcag 120
 ctccaggaa cagccccaa actcctcatc taccataaca acaagcggcc ctcaggggctc 180
 cctgaccgat tctctggctc caagtctggc acctcagcct ccctggccat cactgggctc 240
 caggctgagg atgaggctga ttattactgc cagtcctatg acagcagctc gatcagcacg 300
 attttcggcg gagggaccaa gctcaccgtc cta 333

<210> 208

<211> 111

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> Ab1

<400> 208

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

<220>

<223> Ab2

<400> 210

Gln Ala Val Leu Thr Gln Pro Ser Ser Val Ser Gly Ala Pro Gly Gln
 5 10 15

Arg Val Thr Ile Ser Cys Thr Gly Ser Gly Ser Asn Ile Gly Ala Pro
 20 25 30

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

Leu Ile Tyr His Asn Asn Lys Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe
 50 55 60

Ser Ala Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Ser Leu Ala Ile Thr Gly Leu
 65 70 75 80

Gln Ala Asp Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Ser Tyr Asp Ser Ser
 85 90 95

Leu Ser Gly Ser Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Thr Val Leu
 100 105 110

<210> 211

<211> 333

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<220>

<223> Ab3

<400> 211

Ser Ala Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Ser Leu Ala Ile Thr Gly Leu
65 70 75 80

Gln Ala Asp Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Ser Tyr Asp Ser Ser
85 90 95

Leu Ser Gly Ser Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Thr Val Leu
100 105 110

<210> 213

<211> 333

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<220>

<223> Ab4

<400> 213

caggctgtgc tgactcagcc gtcctcagtg tctggggccc cagggcagag ggtcaccatc 60

tcctgtactg ggagcggctc caacatcggg gcaccttatg atgtaagctg gtaccagcag 120

cttccaggaa cagcccccaa actcctcctc taccataaca acaagcggcc ctcagggggtc 180

cctgaccgat tctctgcctc caagtctggc acctcagcct ccctggccat cactgggctc 240

caggctgacg atgaggctga ttattactgc cagtcctatg acagcagcct gagtgggttcg 300

gttttcggcg gagggaccaa ggtcaccgtc cta 333

<210> 214

<211> 111

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> Ab4

<400> 214

Gln Ala Val Leu Thr Gln Pro Ser Ser Val Ser Gly Ala Pro Gly Gln
 5 10 15

Arg Val Thr Ile Ser Cys Thr Gly Ser Gly Ser Asn Ile Gly Ala Pro
 20 25 30

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

Leu Ile Tyr His Asn Asn Lys Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe
 50 55 60

Ser Ala Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Ser Leu Ala Ile Thr Gly Leu
 65 70 75 80

Gln Ala Asp Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Ser Tyr Asp Ser Ser
 85 90 95

Leu Ser Gly Ser Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Thr Val Leu
 100 105 110

<210> 215

<211> 333

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<220>

<223> Ab5

<400> 215

caggctgtgc tgactcagcc gtcctcagtg tctggggccc cagggcagag ggtcaccatc 60
 tcctgtactg ggagcggctc caacatcggg gcacctatg atgtaagctg gtaccagcag 120
 cttccaggaa cagccccaa actcctcatc taccataaca acaagcggcc ctcaggggtc 180
 cctgaccgat tctctgcctc caagtctggc acctcagcct ccctggccat cactgggctc 240
 caggctgacg atgaggctga ttattactgc cagtcctatg acagcagcct gactgggttc 300
 gttttcggcg gagggaccaa ggtcaccgtc cta 333

<210> 216

<211> 111

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> Ab5

<400> 216

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

<220>

<223> Ab6

<400> 218

Gln Ser Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Gly Ala Pro Gly Gln
 5 10 15

Arg Val Thr Ile Ser Cys Thr Gly Ser Gly Ser Asn Ile Gly Ala Pro
 20 25 30

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

Leu Ile Tyr His Asn Asn Lys Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe
 50 55 60

Ser Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Ser Leu Ala Ile Thr Gly Leu
 65 70 75 80

Gln Ala Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ala Thr Val Glu Ala Gly
 85 90 95

Leu Ser Gly Ser Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
 100 105 110

<210> 219

<211> 333

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<220>

<223> Ab7

<400> 219

caggctgtgc tgactcagcc gtcctcagtg tctggggccc cagggcagag ggtcaccatc 60
 tcctgtactg ggagcggctc caacatcggg gcaccttatg atgtaagctg gtaccagcag 120
 ctccaggaa cagccccaa actcctcatc taccataaca acaagcggcc ctccaggggtc 180
 cctgaccgat tctctgcctc caagtctggc acctcagcct ccctggccat cactgggctc 240
 caggctgacg atgaggctga ttattactgc cagtcctatg acagcagcct gactgggttcg 300
 gtttcggcg gagggaccaa ggtcaccgtc cta 333

<210> 220

<211> 111

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> Ab7

<400> 220

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

<400> 222

Gln Ala Val Leu Thr Gln Pro Ser Ser Val Ser Gly Ala Pro Gly Gln
 5 10 15

Arg Val Thr Ile Ser Cys Thr Gly Ser Gly Ser Asn Ile Gly Ala Pro
 20 25 30

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

Leu Ile Tyr His Asn Asn Lys Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe
 50 55 60

Ser Ala Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Ser Leu Ala Ile Thr Gly Leu
 65 70 75 80

Gln Ala Asp Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Ser Tyr Asp Ser Ser
 85 90 95

Leu Ser Gly Ser Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Thr Val Leu
 100 105 110

<210> 223

<211> 333

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<220>

<223> Ab9

<400> 223

caggctgtgc tgactcagcc gtctctcagtg tctggggccc cagggcagag ggtcaccatc 60

tcctgtactg ggagcggctc caacatcggg gcaccttatg atgtaagctg gtaccagcag 120

cttccaggaa cagcccccaa actcctcatc tatcataaca acaagcggcc ctcaggggtc 180
 cctgaccgat tctctgcctc caagtctggc acctcagcct ccctggccat cactgggctc 240
 caggctgacg atgaggctga ttattactgc cagtcctatg acagcagcct gagtgggtcg 300
 gttttcggcg gagggaccaa ggtcaccgtc cta 333

<210> 224

<211> 111

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> Ab9

<400> 224

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

Gln Ala Asp Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Ser Tyr Asp Ser Ser
 85 90 95

Leu Ser Gly Ser Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Thr Val Leu
 100 105 110

<210> 225

<211> 333

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<220>

<223> Ab10

<400> 225

caggctgtgc tgactcagcc gtcctcagtg tctggggccc cagggcagag ggtcaccatc 60

tcctgtactg ggagcggctc caacatcggg gcaccttatg atgtaagctg gtaccagcag 120

cttccaggaa cagcccccaa actcctcatc tatkataaca acaagcggcc ctcaggggctc 180

cctgaccgat tctctgcctc caagtctggc acctcagcct ccctggccat cactgggctc 240

caggctgacg atgaggctga ttattactgc cagtcctatg acagcagcct gagtgggttcg 300

gttttcggcg gagggaccaa ggtcaccgtc cta 333

<210> 226

<211> 111

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> Ab10

<400> 226

Gln Ala Val Leu Thr Gln Pro Ser Ser Val Ser Gly Ala Pro Gly Gln
 5 10 15

Arg Val Thr Ile Ser Cys Thr Gly Ser Gly Ser Asn Ile Gly Ala Pro
 20 25 30

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

Leu Ile Tyr His Asn Asn Lys Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe
 50 55 60

Ser Ala Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Ser Leu Ala Ile Thr Gly Leu
 65 70 75 80

Gln Ala Asp Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Ser Tyr Asp Ser Ser
 85 90 95

Leu Ser Gly Ser Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Thr Val Leu
 100 105 110

<210> 227

<211> 333

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<220>

<223> Ab11

<400> 227

caggctgtgc tgactcagcc gtcctcagtg tctgggggtcc cagggcagag ggtcaccatc 60
 tcctgtactg ggagcggctc caacatcggg gcaccttatg atgtaagctg gtaccagcag 120
 ctccaggaa cagccccaa actcctcatc tatkataaca acaagcggcc ctcaggggtc 180
 cctgaccgat tctctgcctc caagtctggc acctcagcct ccctggccat cactgggctc 240
 caggctgacg atgaggctga ttattactgc cagtcctatg acagcagcct gagtggttcg 300
 gtttcggcg gagggaccaa ggtcaccgtc cta 333

<210> 228

<211> 111

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> Ab11

<400> 228

Gln Ala Val Leu Thr Gln Pro Ser Ser Val Ser Gly Val Pro Gly Gln
 5 10 15

Arg Val Thr Ile Ser Cys Thr Gly Ser Gly Ser Asn Ile Gly Ala Pro
 20 25 30

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

Leu Ile Tyr His Asn Asn Lys Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe
 50 55 60

Ser Ala Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Ser Leu Ala Ile Thr Gly Leu
 65 70 75 80

Gln Ala Asp Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Ser Tyr Asp Ser Ser
 85 90 95

Leu Ser Gly Ser Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Thr Val Leu
 100 105 110

<210> 229

<211> 333

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<220>

<223> Ab12

<400> 229

caggctgtgc tgactcagcc gtcctcagtg tctggggccc cagggcagag ggtcaccatc 60

tcctgtactg ggagcggctc caacatcggg gcaccttatg atgtaagctg gtaccagcag 120

cttccaggaa cagcccccaa actcctcatc tadcataaca acaagcggcc ctcaggggtc 180

cctgaccgat tctctgcctc caagtctggc acctcagcct ccctggccat cactgggctc 240

caggctgacg atgaggctga ttattactgc cagtcctatg acagcgagcc gaccgagatc 300

cgcttcgggg gagggaccaa gctcacctgc cta 333

<210> 230

<211> 111

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> Ab12

<400> 230

Gln Ala Val Leu Thr Gln Pro Ser Ser Val Ser Gly Ala Pro Gly Gln
 5 10 15

Arg Val Thr Ile Ser Cys Thr Gly Ser Gly Ser Asn Ile Gly Ala Pro
 20 25 30

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

Leu Ile Tyr His Asn Asn Lys Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe
 50 55 60

Ser Ala Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Ser Leu Ala Ile Thr Gly Leu
 65 70 75 80

Gln Ala Asp Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Ser Tyr Asp Ser Glu
 85 90 95

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

<210> 231

<211> 333

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<220>

<223> Ab13

<400> 231

caggctgtgc tgactcagcc gtcctcagtg tctggggccc cagggcagag ggtcaccatc 60
 tcctgtactg ggagcggctc caacatcggg gcaccttatg atgtaagctg gtaccagcag 120
 ctccaggaa cagccccaa actcctcatc taticataaca acaagcggcc ctccaggggtc 180
 cctgaccgat tctctgcctc caagtctggc acctcagcct ccctggccat cactgggctc 240
 caggctgacg atgaggctga ttattactgc cagtcctatg acagcaggac gggcatcatc 300
 gtcttcgggg gagggaccaa ggtcaccgtc cta 333

<210> 232

<211> 111

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> Ab13

<400> 232

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

caggctgtgc tgactcagcc gtcctcagtg tctggggccc cagggcagag ggtcaccatc 60
 tcctgtactg ggagcggctc caacatcggg gcaccttatg atgtaagctg gtaccagcag 120
 ctccaggaa cagcccccaa actcctcatc taccataaca acaagcggcc ctccaggggtc 180
 cctgaccgat tctctgcctc caagtctggc acctcagcct ccctggccat cactgggctc 240
 caggctgacg atgaggctga ttattactgc cagtcctatg acagccagtt gattagcgcc 300
 gccttcgggg gagggaccaa ggtcaccgtc cta 333

<210> 236

<211> 111

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> Ab15

<400> 236

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

<220>

<223> Ab16

<400> 238

Gln Ala Val Leu Thr Gln Pro Ser Ser Val Ser Gly Ala Pro Gly Gln
5 10 15

Arg Val Thr Ile Ser Cys Thr Gly Ser Gly Ser Asn Ile Gly Ala Pro
20 25 30

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

Leu Ile Tyr His Asn Asn Lys Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe
50 55 60

Ser Ala Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Ser Leu Ala Ile Thr Gly Leu
65 70 75 80

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

Leu Ser Gly Ser Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Thr Val Leu
100 105 110

<210> 239

<211> 333

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<220>

<223> Ab17

<400> 239

<400> 242

Gln Ala Val Leu Thr Gln Pro Ser Ser Val Ser Gly Ala Pro Gly Gln
 5 10 15

Arg Val Thr Ile Ser Cys Thr Gly Ser Gly Ser Asn Ile Gly Ala Pro
 20 25 30

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

Leu Ile Tyr His Asn Asn Lys Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe
 50 55 60

Ser Ala Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Ser Leu Ala Ile Thr Gly Leu
 65 70 75 80

Gln Ala Asp Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Ser Tyr Asp Ser Gln
 85 90 95

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

<210> 243

<211> 333

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<220>

<223> Ab19

<400> 243

<220>

<223> Ab20

<400> 246

Gln Ala Val Leu Thr Gln Pro Ser Ser Val Ser Gly Ala Pro Gly Gln
 5 10 15

Arg Val Thr Ile Ser Cys Thr Gly Ser Gly Ser Asn Ile Gly Ala Pro
 20 25 30

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

Leu Ile Tyr His Asn Asn Lys Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe
 50 55 60

Ser Ala Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Ser Leu Ala Ile Thr Gly Leu
 65 70 75 80

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

Leu Ser Gly Ser Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Thr Val Leu
 100 105 110

<210> 247

<211> 360

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<220>

<223> Ab 6 Não Tratado com Linha Germinal

<400> 247

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

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

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

Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 249

<211> 333

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<220>

<223> Ab 6 Não Tratado com Linha Germinal

<400> 249

caggctgtgc tgactcagcc gtcctcagtg tctggggccc cagggcagag ggtcaccatc 60
tcctgtactg ggagcggctc caacatcggg gcaccttatg atgtaagctg gtaccagcag 120
cttccaggaa cagcccccaa actcctcatc tatkataaca acaagcggcc ctcaggggtc 180
cctgaccgat tctctgcctc caagtctggc acctcagcct ccctggccat cactgggctc 240
caggctgacg atgaggctga ttattactgc gcgacggctg aggccggcct gagtggttcg 300
gttttcgggg gagggaccaa gctcaccgtc cta 333

<210> 250

<211> 111

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> Ab 6 Não Tratado com Linha Germinal

<400> 250

Gln Ala Val Leu Thr Gln Pro Ser Ser Val Ser Gly Ala Pro Gly Gln
5 10 15

Arg Val Thr Ile Ser Cys Thr Gly Ser Gly Ser Asn Ile Gly Ala Pro
20 25 30

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

Leu Ile Tyr His Asn Asn Lys Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe
50 55 60

Ser Ala Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Ser Leu Ala Ile Thr Gly Leu
65 70 75 80

Gln Ala Asp Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ala Thr Val Glu Ala Gly
85 90 95

Leu Ser Gly Ser Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
100 105 110

<210> 251

<211> 30

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> Ab 6

<400> 251

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

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

<210> 252

<211> 14

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> Ab 6

<400> 252

Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Met Gly
 5 10

<210> 253

<211> 32

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> Ab 6

<400> 253

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
5 10

Lisboa, 05 de Agosto de 2013

REIVINDICAÇÕES

1. Composição compreendendo uma molécula de anticorpo isolada e um excipiente farmacologicamente aceitável, em que a molécula de anticorpo compreende um domínio VH de anticorpo e um domínio VL de anticorpo, compreendendo o domínio VH de anticorpo regiões determinantes de complementaridade (CDRs) de cadeia pesada HCDR1, HCDR2 e HCDR3 e compreendendo o domínio VL as CDRs de cadeia leve LCDR1, LCDR2 e LCDR3, em que as sequências de aminoácidos das CDRs são:
HCDR1 SEQ ID NO: 53
HCDR2 SEQ ID NO: 54
HCDR3 SEQ ID NO: 55
LCDR1 SEQ ID NO: 58
LCDR2 SEQ ID NO: 59, e
LCDR3 SEQ ID NO: 60.
2. Composição de acordo com a reivindicação 1, em que a molécula de anticorpo é uma molécula de anticorpo humano ou humanizado.
3. Composição de acordo com a reivindicação 1 ou reivindicação 2, em que a molécula de anticorpo compreende a sequência de aminoácidos do domínio VH de anticorpo de SEQ ID NO: 52.
4. Composição de acordo com qualquer uma das reivindicações precedentes, em que a molécula de anticorpo compreende a sequência de aminoácidos do domínio VL de anticorpo de SEQ ID NO: 218.

5. Composição de acordo com qualquer uma das reivindicações 2 a 4, em que a molécula de anticorpo é uma IgG4.
6. Composição de acordo com a reivindicação 5, em que a molécula de anticorpo é uma molécula de anticorpo de IgG4 humana compreende a sequência de aminoácidos do domínio VH de SEQ ID NO: 52 e a sequência de aminoácidos do domínio VL de SEQ ID NO: 218.
7. Composição de acordo com qualquer uma das reivindicações precedentes para ser utilizada num método de tratamento de artrite reumatoide, asma, resposta alérgica, esclerose múltipla, leucemia mieloide, aterosclerose, doença pulmonar obstrutiva crónica ou inflamação das vias aéreas induzida por fumo.
8. Composição de acordo com a reivindicação 7, em que o tratamento compreende administrar a composição em associação ou adicionalmente a um ou mais dos seguintes: NSAIDs, corticosteroides e fármacos antirreumáticos modificadores da doença (DMARDs).
9. Composição para ser utilizada de acordo com a reivindicação 8, em que o tratamento compreende administrar a composição em associação ou adicionalmente a um ou mais dos seguintes: inibidores de cox, prednisona, Humira (adalimumab), metotrexato, Arava, Enbrel (Etanercept), Remicade (Infliximab), Kineret (Anakinra), Rituxan (Rituximab), Orencia (abatacept), sais de ouro, antimaláricos, sulfassalazina, d-penicilamina, ciclosporina A, diclofenac, ciclofosfamida e azatioprina.

10. Composição para ser utilizada de acordo com a reivindicação 9, em que o tratamento compreende administrar a composição em associação com metotrexato.
11. Método de produção de uma molécula de anticorpo compreendendo cultivar uma célula hospedeira contendo ácido nucleico que codifica a molécula de anticorpo, em seguida purificar a molécula de anticorpo, em que a molécula de anticorpo compete para ligar o domínio extracelular do GM-CSFR α com uma molécula de anticorpo possuindo o domínio VH de SEQ ID NO: 52 e o domínio VL de SEQ ID NO: 218.
12. Método de acordo com a reivindicação 11, em que a molécula de anticorpo liga o domínio extracelular do GM-CSFR α humano com uma afinidade (K_D) inferior a 5 nM num ensaio de ressonância plasmônica superficial.
13. Método de produção de uma molécula de anticorpo contra o GM-CSFR α humano, compreendendo o método proporcionar, por meio de inserção, supressão ou substituição de um ou mais aminoácidos na sequência de aminoácidos de um domínio VH parental compreendendo HCDR1, HCDR2 e HCDR3, um domínio VH que é uma variante da sequência de aminoácidos do domínio VH parental; em que
a VH CDR1 parental tem uma sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 53;
a VH CDR2 parental tem uma sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 54; e
a VH CDR3 parental tem uma sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 55;

combinar o domínio VH assim proporcionado com um ou mais domínios VL para proporcionar uma ou mais combinações VH/VL;

em que os referidos um ou mais domínios VL são proporcionados por meio de inserção, supressão ou substituição de um ou mais aminoácidos na sequência de aminoácidos de um domínio VL parental compreendendo LCDR1, LCDR2 e LCDR3; em que

a VL CDR1 parental tem uma sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 58;

a VL CDR2 parental tem uma sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 59; e

a VL CDR3 parental tem uma sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 60; e

testar a combinação ou combinações VH/VL para identificar uma molécula de anticorpo contra o GM-CSFR α humano.

Lisboa, 05 de Agosto de 2013

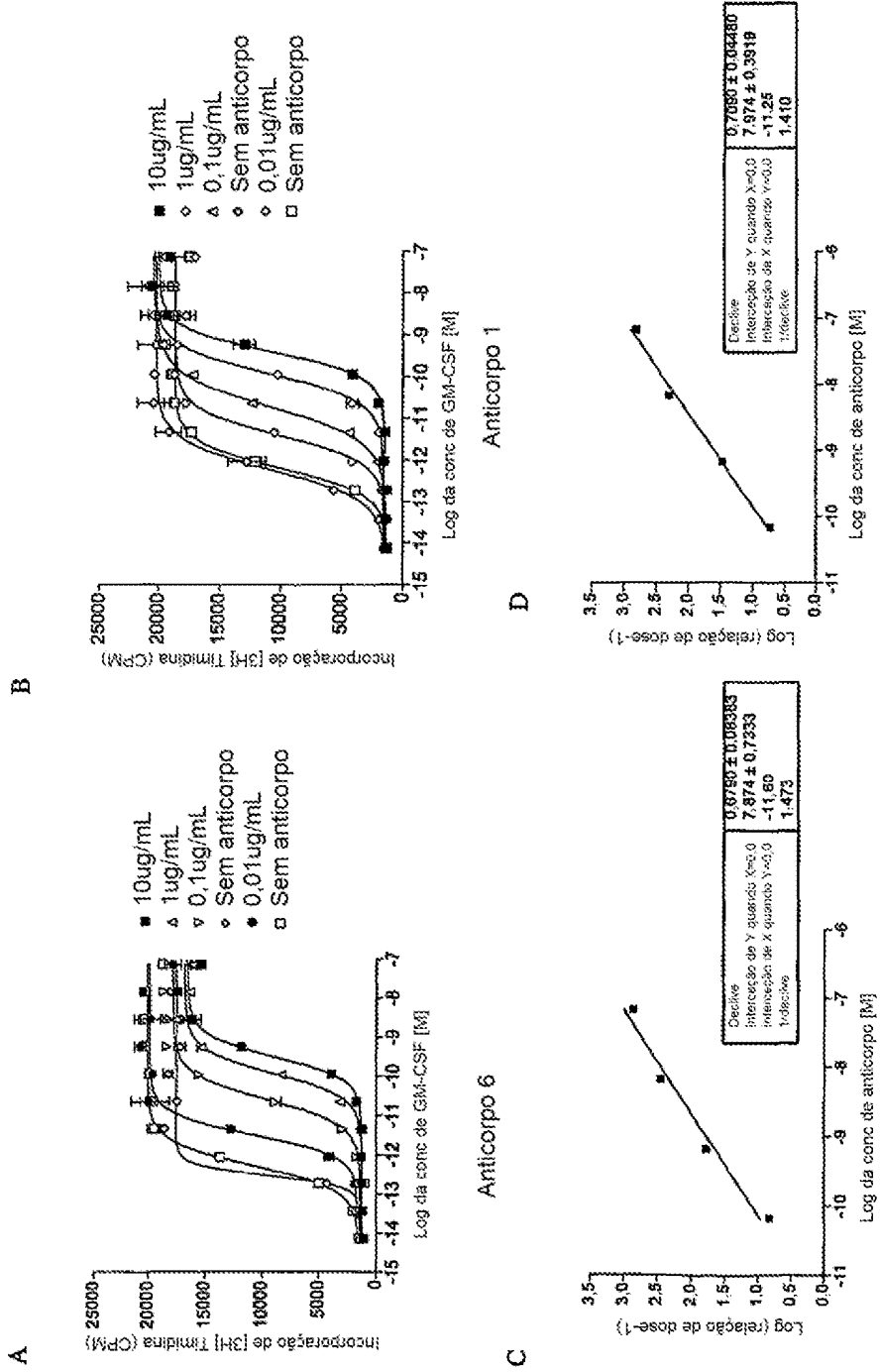


Figura 1

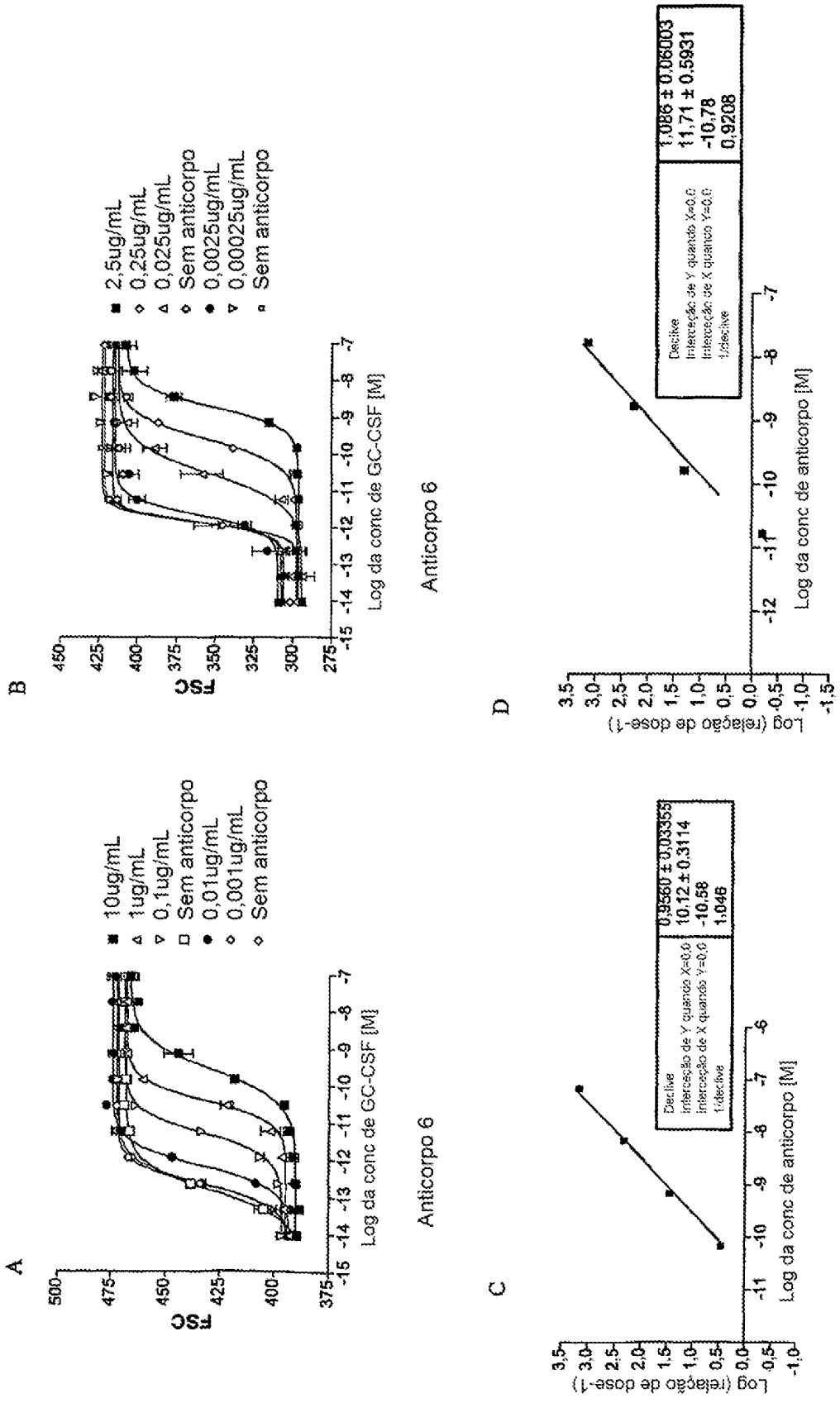


Figura 2

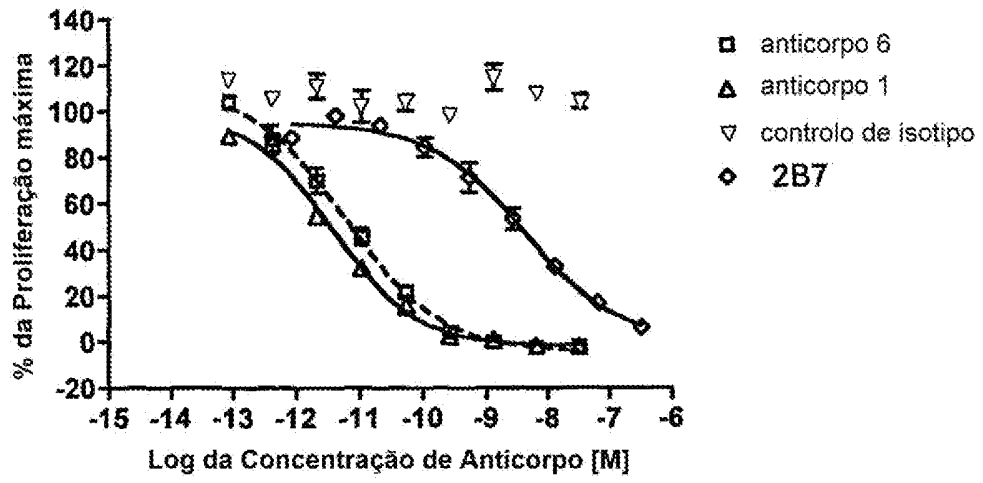


Figura 3

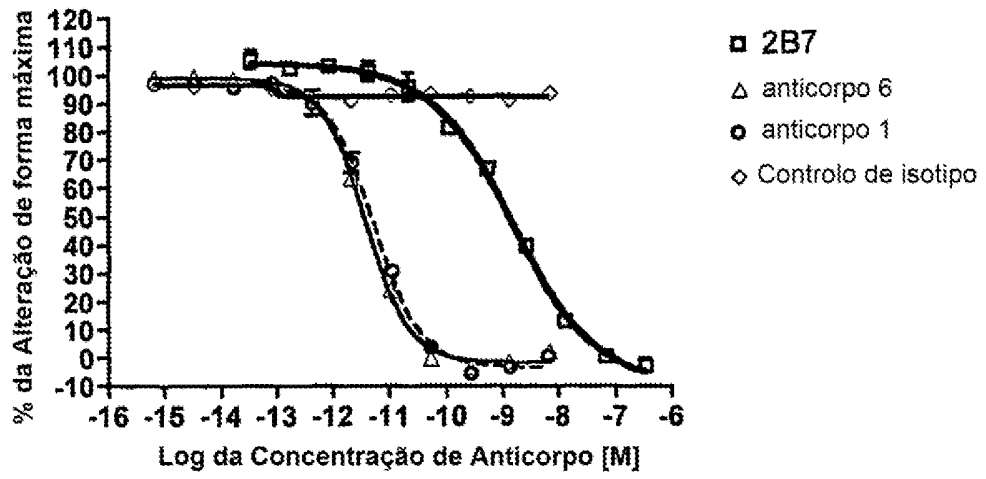


Figura 4

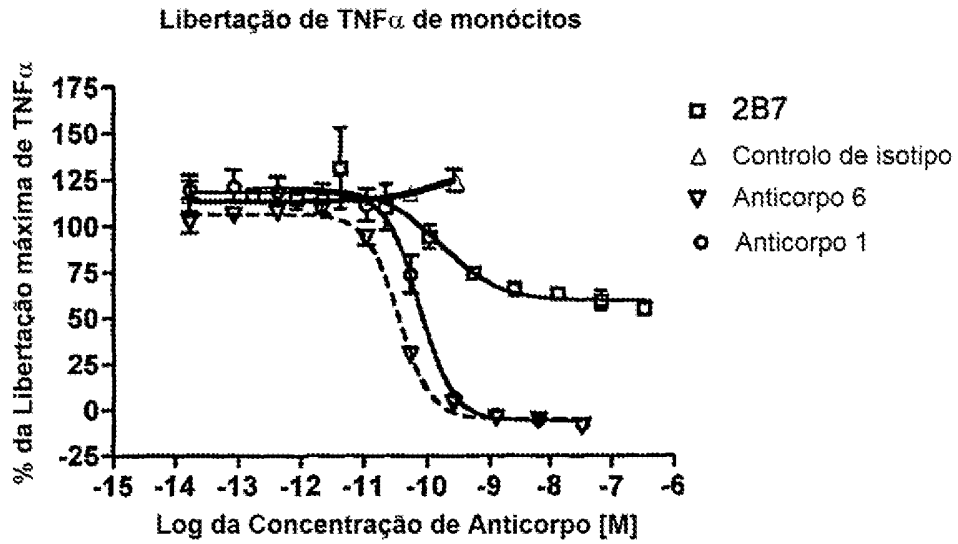


Figura 5

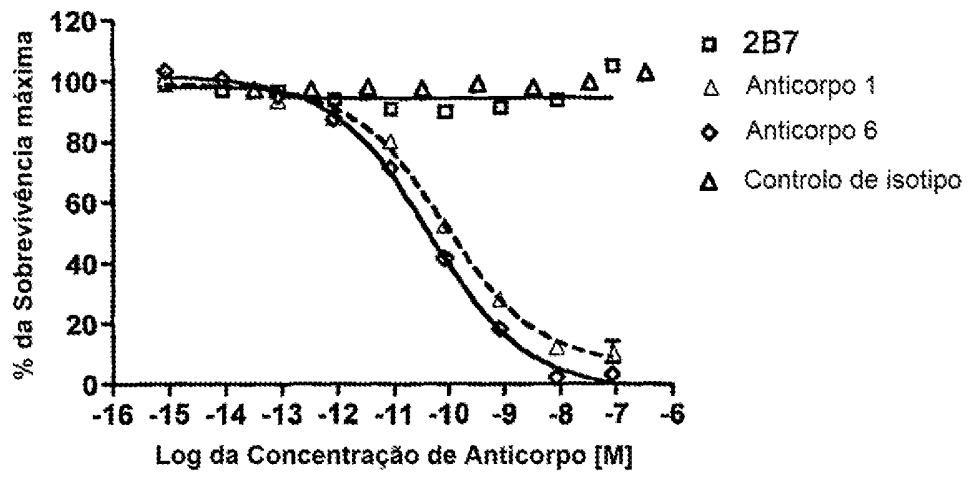


Figura 6

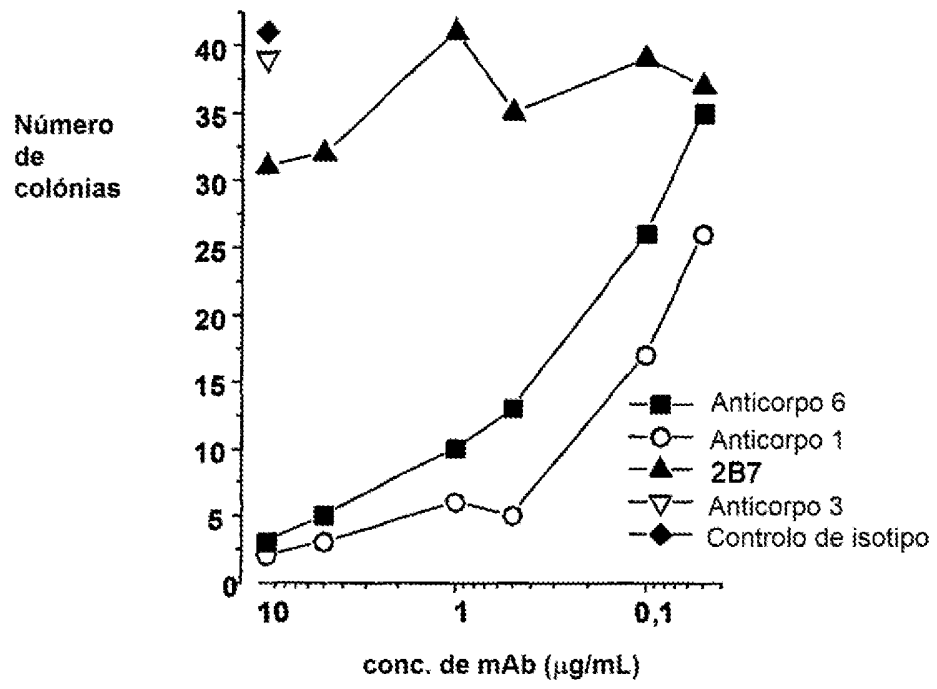


Figura 7

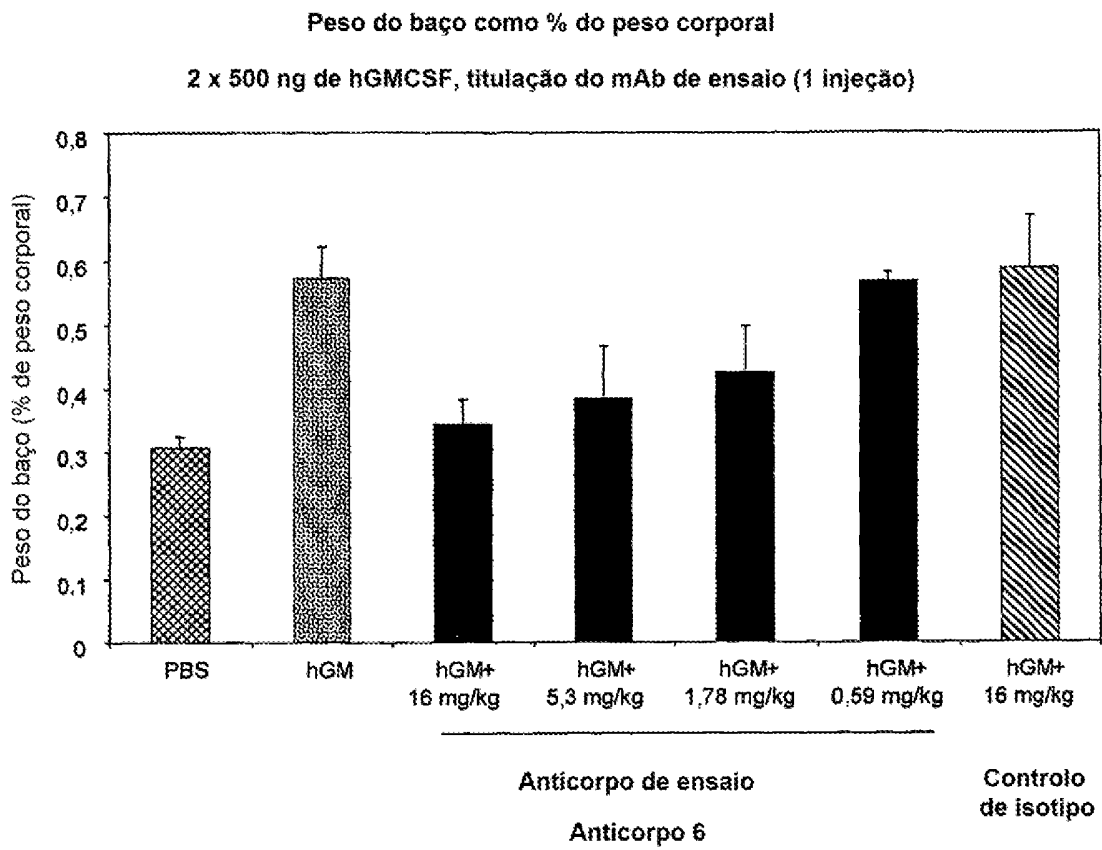
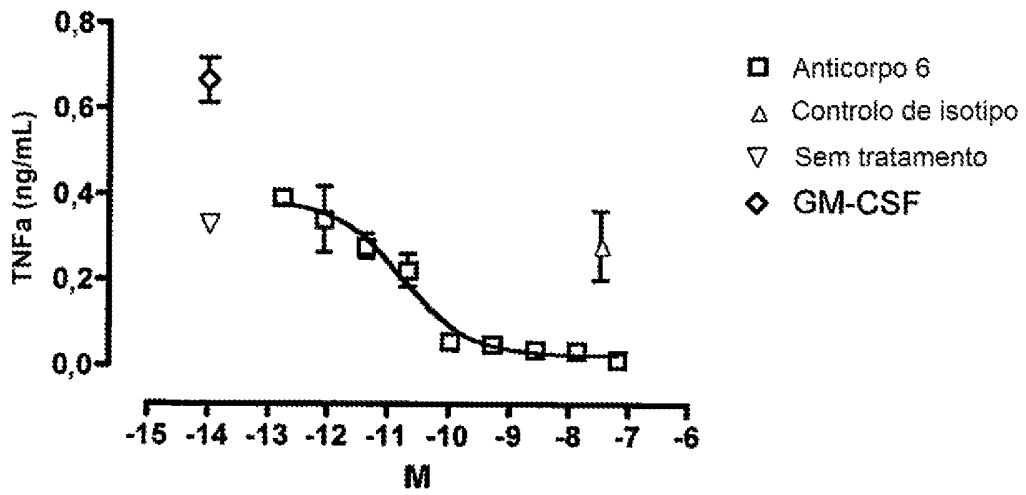


Figura 8

A



B

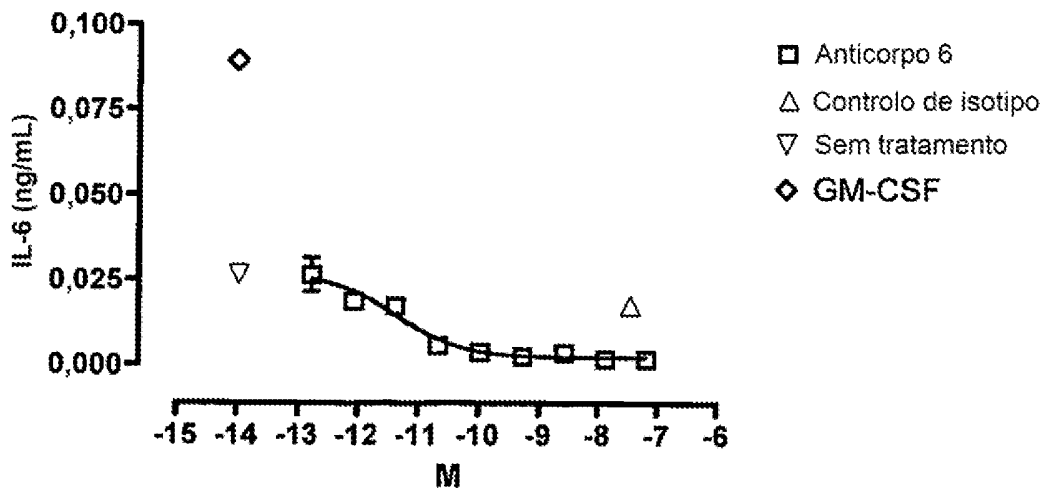


Figura 9