

(12) FASCÍCULO DE PATENTE DE INVENÇÃO

(51) Classificação Internacional:

C12N 15/09 (2015.01) **A61K 39/395** (2015.01)
A61P 1/04 (2015.01) **A61P 1/16** (2015.01)
A61P 3/10 (2015.01) **A61P 7/06** (2015.01)
A61P 9/00 (2015.01) **A61P 9/10** (2015.01)
A61P 11/00 (2015.01) **A61P 11/06** (2015.01)
A61P 13/12 (2015.01) **A61P 15/08** (2015.01)
A61P 17/00 (2015.01) **A61P 17/06** (2015.01)
A61P 19/02 (2015.01) **A61P 19/10** (2015.01)
A61P 21/00 (2015.01) **A61P 25/00** (2015.01)
A61K 39/00 (2015.01) **C07K 16/28** (2015.01)

(22) Data de pedido: **2009.09.25**

(30) Prioridade(s): **2008.09.26 JP 2008248213**
2009.03.13 JP 2009060806
2009.03.19 JP 2009067925

(43) Data de publicação do pedido: **2011.06.08**

(45) Data e BPI da concessão: **2015.06.17**
184/2015

(73) Titular(es):

CHUGAI SEIYAKU KABUSHIKI KAISHA
5-1, UKIMA 5-CHOME KITA-KU TOKYO 115-8543
JP

(72) Inventor(es):

HIROYUKI TSUNODA **JP**
TOMOYUKI IGAWA **JP**
TETSUO KOJIMA **JP**
SHINYA ISHII **JP**
ATSUHIKO MAEDA **JP**

(74) Mandatário:

JOSÉ EDUARDO LOPES VIEIRA DE SAMPAIO
R DO SALITRE 195 RC DTO 1250-199 LISBOA **PT**

(54) Epígrafe: **MOLÉCULA DE ANTICORPO MELHORADA CONTRA RECETORES DE IL-6**

(57) Resumo:

A PRESENTE INVENÇÃO TEM POR OBJETO COMPOSIÇÕES FARMACÊUTICAS QUE CONTÊM MOLÉCULAS DE SEGUNDA GERAÇÃO QUE SÃO SUPERIORES A TOCILIZUMABE, POR MEIO DA ALTERAÇÃO DAS SEQUÊNCIAS DE AMINOÁCIDOS DAS REGIÕES VARIÁVEL E CONSTANTE DE TOCILIZUMABE, QUE É UM ANTICORPO HUMANIZADO, IGG 1, ANTI-RECETOR DE IL-6, PARA AUMENTAR A CAPACIDADE DE NEUTRALIZAÇÃO DO ANTIGÉNIO E MELHORAR A FARMACOCINÉTICA, DE TAL MODO QUE O EFEITO TERAPÊUTICO É EXERCIDO COM UMA MENOR FREQUÊNCIA DE ADMINISTRAÇÃO E COM UMA MELHORIA DAS PROPRIEDADES DE IMUNOGENICIDADE, SEGURANÇA E PROPRIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS (ESTABILIDADE E HOMOGENEIDADE). A PRESENTE INVENÇÃO TAMBÉM TEM POR OBJETO PROCESSOS PARA A PRODUÇÃO DESTAS COMPOSIÇÕES FARMACÊUTICAS. OS REQUERENTES GERARAM COM SUCESSO MOLÉCULAS DE SEGUNDA GERAÇÃO QUE SÃO SUPERIORES A TOCILIZUMABE, POR COMBINAÇÃO APROPRIADA DE ALTERAÇÕES DAS SEQUÊNCIAS DE AMINOÁCIDOS NOS DOMÍNIOS DE RDC, NAS REGIÕES VARIÁVEIS E NAS REGIÕES CONSTANTES.

DESCRIÇÃO

MOLÉCULA DE ANTICORPO MELHORADA CONTRA RECETORES DE IL-6

Domínio técnico

A presente invenção tem por objeto composições farmacêuticas que contêm, como princípio ativo, um anticorpo anti-recetor de IL-6, tal como se define nas reivindicações, processos para a produção das composições, etc. Além disso, a presente invenção, de uma maneira geral, tem por objeto composições farmacêuticas que contêm, como princípio ativo, um anticorpo anti-recetor de IL-6, processos para a produção das composições, etc.

Técnica anterior

Os anticorpos estão a chamar a atenção, como produtos farmacêuticos, por serem altamente estáveis no plasma e terem poucos efeitos adversos. Entre eles, está disponível no mercado um certo número de produtos farmacêuticos de anticorpo, do tipo IgG e, atualmente, estão a ser desenvolvidos muitos produtos farmacêuticos de anticorpos (documentos 1 e 2 fora das patentes). IL-6 é uma citocina envolvida em várias doenças auto-imunes, doenças inflamatórias, tumores malignos, etc. (documento 3 fora das patentes). TOCILIZUMABE, um anticorpo humanizado, IgG 1, anti-recetor de IL-6, liga-se especificamente ao recetor de IL-6. Pensa-se que o TOCILIZUMABE pode ser utilizado como um agente terapêutico para doenças associadas a IL-6 tal como artrite reumatóide, dado que neutraliza a atividade biológica de IL-6 (documento de patentes 1 a 3 e documentos 4 e 25 não pertencentes a patentes). O TOCILIZUMABE foi

aprovado como agente terapêutico para a doença de Castleman e a artrite reumatóide no Japão (document 5 não pertencente a patentes).

Anticorpos humanizados, tal como TOCILIZUMABE, são produtos farmacêuticos de anticorpos de primeira geração. Os produtos farmacêuticos de anticorpos de segunda geração estão atualmente a ser desenvolvidos para melhorar a eficácia, a conveniência e o custo dos produtos farmacêuticos de anticorpos de primeira geração. Estão a ser desenvolvidas várias tecnologias que se podem aplicar aos produtos farmacêuticos de anticorpos de segunda geração. Já foram relatadas tecnologias para melhorar a função efetora, a capacidade de ligação ao antigénio, a farmacocinética e a estabilidade, assim como tecnologias para a redução do risco de imunogenicidade (documentos 7 a 10 das patentes). Para alterar a função do anticorpo, as modificações de aminoácidos, provaram ser especialmente úteis (documentos 7, 10 e 11 das patentes e documentos 26 e 27 fora das patentes).

Como processos para aumentar a eficácia do fármaco ou para reduzir a dosagem, têm sido referidas tecnologias que aumentam a atividade citotóxica mediada por células dependentes do anticorpos (atividade CCDA) ou atividade citotóxica dependente do complemento (atividade CDP) através da substituição, na região Fc, de um anticorpo IgG (documento 6 fora das patentes). Além disso, a maturação da afinidade tem sido referida como uma tecnologia para aumentar a capacidade de ligação ao antigénio ou a capacidade de neutralização do antigénio (documento 7 fora das patentes). Esta tecnologia permite aumentar a atividade de ligação ao antigénio por meio da introdução de mutações de aminoácidos na região de determinação de

complementaridade (RDC) de uma região variável ou similar. O aumento da capacidade de ligação ao antigénio melhora a atividade biológica *in vitro* ou reduz a dosagem e, além disso, aumenta a eficácia *in vivo* (documento 8 fora das patentes). Atualmente estão a ser realizados ensaios clínicos para avaliar o motavizumabe (produzido por maturação da afinidade), que se espera que tenha uma eficácia superior ao palivizumabe, um produto farmacêutico de anticorpo anti-RSV de primeira geração (documento 9 fora das patentes). Já foi referenciado um anticorpo anti-recetor de IL-6 com uma afinidade de cerca de 0,05 nM (isto é, uma afinidade superior à do TOCILIZUMABE) (documento 4 das patentes). Contudo, não há qualquer relatório que descreva um anticorpo humano, humanizado ou quimérico com uma afinidade superior a 0,05 nM.

Um problema encontrado com os atuais produtos farmacêuticos de anticorpos é o elevado custo de produção associado a quantidades extremamente grandes de proteína a ser administrada. Por exemplo, tem-se estimado a dosagem de TOCILIZUMABE, um anticorpo humanizado IgG1, anti-recetor de IL-6, como sendo de cerca de 8 mg/kg/mês, por injeção intravenosa (documento 4 fora das patentes). A forma preferida de administração é uma formulação subcutânea em doenças auto-imunes crónicas. Em geral, é necessário que as formulações subcutâneas são formulações de concentração elevada. De uma perspetiva da estabilidade ou similar, o limite das formulações de anticorpo do tipo IgG é geralmente de cerca de 100 mg/ml (documento 10 fora das patentes). Os produtos farmacêuticos de anticorpos, de segunda geração, convenientes e de baixo custo que podem ser administrados subcutaneamente, a intervalos mais longos, podem ser providenciados por aumento do semi-período de vida de um anticorpo no plasma para prolongar o

seu efeito terapêutico e assim reduzir a quantidade de proteína a ser administrada e conferindo ao anticorpo uma elevada estabilidade.

FcRn está fortemente envolvida na farmacocinética do anticorpo. No que respeita às diferenças do semi-período de vida dos isotipos do anticorpo no plasma, sabe-se que IgG1 e IgG2 têm um semi-período de vida no plasma superior ao de IgG3 e de IgG4 (documento 11 fora das patentes). Como processo para aumentar mais o semi-período de vida dos anticorpos IgG1 e IgG2 no plasma, que têm um semi-período de vida maior no plasma, tem sido referida a substituição de aminoácidos na região constante que aumenta a ligação a FcRn (documentos 12 e 13 fora das patentes). Do ponto de vista da imunogenicidade, faz-se mais um aumento do semi-período de vida no plasma por substituição de aminoácidos, preferencialmente na região variável, em vez de ser na região constante (document 5 das patentes). Contudo, até à data, não há qualquer referência ao aumento do semi-período de vida dos anticorpos do recetor de IL-6 no plasma, através da alteração da região variável.

Outro problema importante encontrado no desenvolvimento de produtos bio-farmacêuticos é a imunogenicidade. Em geral, a imunogenicidade dos anticorpos de rato é reduzida pela humanização do anticorpo. Assume-se que o risco de imunogenicidade pode ser ainda reduzido utilizando, como matriz, uma sequência estrutural da linha germinal na humanização do anticorpo (documento 14 fora das patentes). Contudo, mesmo o adalimumabe, um anticorpo anti-FNT, completamente humano, exibiu uma imunogenicidade de elevada frequência (13 % a 17 %) e verificou-se que o efeito terapêutico era reduzido em doentes que exibiram imunogenicidade (documentos 15 e 16 não pertencentes a

patentes). Os epítomos de células T podem estar presentes mesmo na RDC de anticorpos humanos e estes epítomos de células T na RDC são a causa possível da imunogenicidade. Os processos *in silico* e *in vitro* para a previsão de epítomos de células T já foram referenciados (documentos 17 e 18 não pertencentes a patentes). Está assumido que o risco de imunogenicidade pode ser reduzido por meio da eliminação dos epítomos de células T previstos utilizando esses processos (documento 19 fora das patentes).

O TOCILIZUMABE, um anticorpo humanizado anti-recetor de IL-6, IgG1, é um anticorpo IgG1 obtido por humanização do anticorpo de murganho PM1. Faz-se o enxerto da RDC utilizando, como estruturas-matrizes, as sequências NEW e REI, para as cadeias P e L, respetivamente; contudo, cinco sequências de aminoácidos de murganhos ficam retidas na estrutura como aminoácidos essenciais para a manutenção da atividade (documento 20 fora das patentes). Não há nenhum relatório anterior que refira a humanização completa da sequência remanescente de murganho na estrutura do anticorpo humanizado TOCILIZUMABE, sem redução da atividade. Além disso, a sequência da RDC de TOCILIZUMABE é uma sequência de murganho e assim, tal como o adalimumabe, pode ter epítomos de células T na RDC, que pode ter um risco potencial de imunogenicidade. Nos ensaios clínicos de TOCILIZUMABE, não se detetaram anticorpos anti-TOCILIZUMABE para uma dose eficaz de 8 mg/kg, mas observaram-se para doses de 2 mg/kg e de 4 mg/kg (documento 6 das patentes). Isto sugere que há ainda espaço para melhoria da imunogenicidade de TOCILIZUMABE. Contudo, não há qualquer relatório sobre a redução do risco de imunogenicidade de TOCILIZUMABE, por meio da substituição de aminoácidos.

O isotipo de TOCILIZUMABE é IgG1. A diferença do isotipo refere-se à diferença na sequência da região constante. Dado que se assume que a sequência de região constante tem uma forte influência na função efetora, na farmacocinética, nas propriedades físicas, etc., a seleção da sequência da região constante é muito importante para o desenvolvimento de produtos farmacêuticos de anticorpos (documento 11 fora das patentes). Nos últimos anos, a segurança dos produtos farmacêuticos de anticorpos tornou-se de enorme importância. A interação entre a porção de Fc do anticorpo e o recetor de Fcγ (função efetora) pode ter causado efeitos adversos sérios nos ensaios clínicos da fase I de TGN1412 (documento 21 fora das patentes). Para os produtos farmacêuticos de anticorpos concebidos para neutralizar a atividade biológica de um antigénio, a ligação ao recetor de Fcγ, que é importante para funções efectoras, tais como a CCDA, é desnecessária. A ligação ao recetor Fcγ pode mesmo ser desfavorável do ponto de vista dos efeitos adversos. Um processo para a redução da ligação ao recetor de Fcγ consiste em alterar o isotipo de um anticorpo IgG, de IgG1 para IgG2 ou IgG4 (documento 22 fora das patentes). IgG2 é mais favorável do que IgG4, do ponto de vista da farmacocinética e da ligação do recetor I de Fcγ (documento 11 fora das patentes). O TOCILIZUMABE é um anticorpo de neutralização do recetor de IL-6 e o seu isotipo é a IgG1. Assim, tendo em vista os potenciais efeitos adversos, IgG2 pode ser um isotipo preferido, dado que as funções efectoras, tal como CCDA, não são necessárias.

Entretanto, quando se desenvolvem produtos farmacêuticos de anticorpos, as propriedades físico-químicas das proteínas, em particular a homogeneidade e a estabilidade, são muito cruciais. Tem sido referido que

para o isotipo IgG2, há uma heterogeneidade significativa derivada de ligações de di-sulfureto na região de charneira (documento 23 fora das patentes). Não é fácil e será mais caro fabricá-los, em larga escala, como produtos farmacêuticos, embora se mantenham as substâncias objetivo/substâncias relacionadas, que estão relacionadas com a heterogeneidade derivada de ligações de di-sulfureto entre as produções. Assim, são desejáveis substâncias simples, tantas quanto possível. Além disso, para a heterogeneidade das sequências de terminal C da cadeia P do anticorpo, a eliminação do resíduo de aminoácido lisina, no terminal C e a amidação do grupo carboxilo do terminal C devido à eliminação dos dois aminoácidos do terminal C, glicina e lisina, já foram relatadas (documento 24 fora das patentes). Ao desenvolver anticorpos do isotipo IgG2, como produtos farmacêuticos, é preferível reduzir essa heterogeneidade e manter uma estabilidade elevada. Para produzir formulações convenientes, estáveis, de elevada concentração, administradas subcutâneamente, é preferível que não só a estabilidade seja elevada, mas também que o semi-período de vida no plasma seja superior ao de IgG1, que é o isotipo de TOCILIZUMABE. Contudo, não há nenhum relatório anterior sobre as sequências da região constante para anticorpos com a região constante do isotipo IgG2 que tenham uma reduzida heterogeneidade, estabilidade elevada e semi-período de vida no plasma superior ao dos anticorpos com a região constante do isotipo IgG1.

A seguir mostram-se documentos da técnica anterior, relacionados com a presente descrição:

[Documentos da técnica anterior]

[Documentos de patentes]

[Documento 1 de patentes] WO 92/19759

[Documento 2 de patentes] WO 96/11020

[Documento 3 de patentes] WO 96/12503

[Documento 4 de patentes] WO 2007/143168

[Documento 5 de patentes] WO 2007/114319

[Documento 6 de patentes] WO 2004/096273

[Documento 7 de patentes] EP: 2206775

[Documento 8 de patentes] EP: 2194066

[Documento 9 de patentes] EP: 2275443

[Documento 10 de patentes] EP: 2202245

[Documento 11 de patentes] JP 2163096

[Documentos não pertencentes a patentes]

[Documento 1 não pertencente a patentes] Janice M Reichert, Clark J Rosensweig, Laura B Faden & Matthew C Dewitz, Monoclonal antibody successes in the clinic, Nature Biotechnology 23, 1073 - 1078 (2005).

[Documento 2 não pertencente a patentes] Pavlou AK, Belsey MJ., The therapeutic antibodies market to 2008., Eur J Pharm Biopharm. 2005 Abr; 59(3): 389-96.

[Documento 3 não pertencente a patentes] Nishimoto N, Kishimoto T., Interleukin 6: from bench to bedside., Nat Clin Pract Rheumatol. Nov. 2006; 2(11): 619-26.

[Documento 4 não pertencente a patentes] Maini RN, Taylor PC, Szechinski J, Pavelka K, Broll J, Balint G, Emery P, Raemen F, Petersen J, Smolen J, Thomson D, Kishimoto T; CHARISMA Study Group., Double-blind randomized controlled clinical trial of the interleukin-6 receptor antagonist, Tocilizumab, in

European patients with rheumatoid arthritis who had an incomplete response to methotrexate., *Arthritis Rheum.* Set 2006; 54(9): 2817-29.

[Documento 5 não pertencente a patentes] Nishimoto N, Kanakura Y, Aozasa K, Johkoh T, Nakamura M, Nakano S, Nakano N, Ikeda Y, Sasaki T, Nishioka K, Hara M, Taguchi H, Kimura Y, Kato Y, Asaoku H, Kumagai S, Kodama F, Nakahara H, Hagihara K, Yoshizaki K, Kishimoto T. Humanized anti-interleukin-6 receptor antibody treatment of multicentric Castleman disease. *Blood.* 15 Out 2005; 106(8): 2627-32.

[Documento 6 não pertencente a patentes] Kim SJ, Park Y, Hong HJ., Antibody engineering for the development of therapeutic antibodies, *Mol Cells.* 31 Ago 2005; 20(1): 17-29. Review.

[Documento 7 não pertencente a patentes] Rothe A, Hosse RJ, Power BE. Ribosome display for improved biotherapeutic molecules. *Expert Opin Biol Ther.* Fev 2006; 6(2): 177-87.

[Documento 8 não pertencente a patentes] Rajpal A, Beyaz N, Haber L, Cappuccilli G, Yee H, Bhatt RR, Takeuchi T, Lerner RA, Crea R., A general method for greatly improving the affinity of antibodies by using combinatorial libraries., *Proc Natl Acad Sci USA.* 14 Jun 2005; 102 (24): 8466-71 Epub 6 Jun 2005.

[Documento 9 não pertencente a patentes] Wu H, Pfarr DS, Johnson S, Brewah YA, Woods RM, Patel NK, White WI, Young JF, Kiener PA. Development of Motavizumab, an Ultra-potent Antibody for the Prevention of Respiratory Syncytial Virus Infection in the Upper and Lower Respiratory Tract. *J Mol Biol.* 2007, 368, 652-665.

[Documento 10 não pertencente a patentes] Shire SJ, Shahrokh Z, Liu J. Challenges in the development of

high protein concentration formulations. J Pharm Sci. Jun 2004; 93 (6): 1390-402

[Documento 11 não pertencente a patentes] Salfeld JG. Isotype selection in antibody engineering. Nat Biotechnol. Dez 2007; 25(12): 1369-72.

[Documento 12 não pertencente a patentes] Hinton PR, Xiong JM, Johlfs MG, Tang MT, Keller S, Tsurushita N., An engineered human IgG1 antibody with longer serum half-life., J Immunol. 1 Jan 2006; 176(1): 346-56.

[Documento 13 não pertencente a patentes] Ghetie V, Popov S, Borvak J, Radu C, Matesoi D, Medesan C, Ober RJ, Ward ES., Increasing the serum persistence of an IgG fragment by random mutagenesis., Nat Biotechnol. Jul 1997; 15(7): 637-40.

[Documento 14 não pertencente a patentes] Hwang WY, Almagro JC, Buss TN, Tan P, Foote J. Use of human germline genes in a CDR homology-based approach to antibody humanization. Methods. Maio 2005; 36(1): 35-42.

[Documento 15 não pertencente a patentes] Bartelds GM, Wijbrandts CA, Nurmohamed MT, Stapel S, Lems WF, Aarden L, Dijkmans BA, Tak P, Wolbink GJ. Clinical response to adalimumab: The relationship with anti-adalimumab antibodies and serum adalimumab concentrations in rheumatoid arthritis. Ann Rheum Dis. 9 Mar 2007; [Epub antes da impressão]

[Documento 16 não pertencente a patentes] Bender NK, Heilig CE, Droll B, Wohlgemuth J, Armbruster FP, Heilig B. Immunogenicity, efficacy and adverse events of adalimumab in RA patients. Rheumatol Int. Jan 2007; 27(3): 269-74.

[Documento 17 não pertencente a patentes] Van Walle I, Gansemans Y, Parren PW, Stas P, Lasters I. Immunogenicity screening in protein drug

development. *Expert Opin Biol Ther.* Mar 2007; 7(3): 405-18.

[Documento 18 não pertencente a patentes] Jones TD, Phillips WJ, Smith BJ, Bamford CA, Nayee PD, Baglin TP, Gaston JS, Baker MP. Identification and removal of a promiscuous CD4+ T cell epitope from the C1 domain of factor VIII. *J Thromb Haemost.* Maio 2005; 3(5): 991-1000.

[Documento 19 não pertencente a patentes] Chirino AJ, Ary ML, Marshall SA. Minimizing the immunogenicity of protein therapeutics. *Drug Discov Today.* 15 Jan 2004; 9(2): 82-90.

[Documento 20 não pertencente a patentes] Sato K, Tsuchiya M, Saldanha J, Koishihara Y, Ohsugi Y, Kishimoto T, Bendig MM. Reshaping a human antibody to inhibit the interleukin 6-dependent tumor cell growth. *Cancer Res.* 15 Fev 1993; 53(4): 851-6.

[Documento 21 não pertencente a patentes] Strand V, Kimberly R, Isaacs JD. Biologic therapies in rheumatology: lessons learned future directions. *Nat Rev Drug Discov.* Jan 2007; 6(1): 75-92.

[Documento 22 não pertencente a patentes] Gessner JE, Heiken H, Tamm A, Schmidt RE. The IgG Fc receptor family. *Ann Hematol.* Jun 1998; 76 (6): 231-48

[Documento 23 não pertencente a patentes] Dilion TM, Ricci MS, Vezina C, Flynn GC, Liu YD, Rehder DS, Plant M, Henkle B, Li Y, Deechongkit S, Varnum B, Wypych J, Balland A, Bondarenko PV. Structural and functional characterization of disulfide isoforms of the human IgG2 subclass. *J Biol Chem.* 6 Jun 2008; 283 (23): 16206-15

[Documento 24 não pertencente a patentes] Johnson KA, Paisley-Flango K, Tangarone BS, Porter TJ, Rouse JC. Cation exchange-HPLC and mass spectrometry reveal C-

terminal amidation of an IgG1 heavy chain. Anal Biochem. 1 Jan 2007; 360(1): 75-83.

[Documento 25 não pertencente a patentes] Yoshiyuki O, Gekkan Pharm Stage 2007; 7(5): 13-18.

[Documento 26 não pertencente a patentes] Onda M, et al., Lowering the isoelectric point of the Fv portion of recombinant immunotoxins leads to decreased nonspecific animal toxicity without affecting antitumor activity., Cancer Res. 2001, 61: 5070-77.

[Documento 27 não pertencente a patentes] Ito W. et al., The His-probe method: effects of histidine residues introduced into the complementary-determining regions of antibodies on antigen-antibody interactions at different pH values., FEBS Letter 1992; 309(1): 85-88.

Descrição da invenção

[Problemas a serem resolvidos pela presente invenção]

A presente invenção foi completada tendo em conta as circunstâncias anteriores. Um objetivo aqui descrito consiste em providenciar composições farmacêuticas que contêm moléculas de segunda geração que são superiores ao anticorpo humanizado, IgG1, anti-recetor de IL-6, TOCILIZUMABE, por meio da alteração das sequências de aminoácidos das regiões variáveis e constantes de TOCILIZUMABE, para aumentar a capacidade de neutralização de antigénios e melhorar a farmacocinética, de tal forma que seja exercido um efeito terapêutico prolongado com uma menor frequência de administração e com melhoria da imunogenicidade, da segurança e das propriedades físico-químicas (estabilidade e homogeneidade) (daqui em diante estas composições farmacêuticas podem também ser referidas

como "agentes" ou como "formulações"). Um outro objetivo consiste em providenciar processos para produzir essas composições farmacêuticas.

[Meios para resolver os problemas]

Realizaram-se estudos dedicados para gerar moléculas de segunda geração, tal como definidas nas reivindicações, que são superiores ao anticorpo IgG1 humanizados do recetor anti-IL-6, TOCILIZUMABE, de primeira geração, por meio da alteração das sequências de aminoácidos nas regiões variáveis e constantes de TOCILIZUMABE para aumentar a eficácia e melhorar a farmacocinética, de tal forma que seja exercido um efeito terapêutico prolongado com uma menor frequência de administração e com uma melhoria da imunogenicidade, da segurança e das propriedades físico-químicas (estabilidade e homogeneidade). Como resultado, descobriram-se várias mutações de várias RDC nas regiões variáveis de TOCILIZUMABE que melhoram a capacidade de ligação (afinidade) ao antigénio. Assim, a afinidade foi significativamente aumentada, com sucesso, utilizando uma combinação dessas mutações. Também se melhora a farmacocinética pela introdução de modificações que baixam, com sucesso, o ponto isoelétrico da sequência de região variável.

Também se melhora a farmacocinética fazendo a ligação ao antigénio do recetor de IL-6 ficar dependente do pH, de tal modo que uma única molécula de anticorpo pode neutralizar várias vezes o antigénio, com sucesso. Além disso, o risco de imunogenicidade tem sido reduzido com sucesso por meio de sequências derivadas de murganho, completamente humanizadas, que permanecem na estrutura de TOCILIZUMABE e reduzindo o número de péptidos de epítomos

de células T nas regiões variáveis previstas *in silico*. Além disso, também têm sido descobertas novas sequências de regiões constantes, para a região constante de TOCILIZUMABE, que reduzem a ligação ao recetor de Fey, em comparação com IgG1, para melhorar a segurança, melhorar a farmacocinética, em comparação com IgG1 e reduzir a heterogeneidade devida a ligações de bi-sulfureto na região de charneira de IgG2 e a heterogeneidade devida ao terminal C da cadeia P, sem decréscimo da estabilidade. As moléculas de segunda geração, que são superiores a TOCILIZUMABE, têm sido produzidas com sucesso por meio da combinação apropriada destas alterações das sequências de aminoácidos nas RDC, nas regiões variáveis e nas regiões constantes.

A presente invenção tem por objeto composições farmacêuticas que contêm um anticorpo, IgG, humanizado, contra o recetor de IL-6, com uma capacidade superior de ligação ao antigénio (recetor de IL-6), com uma farmacocinética superior, uma segurança superior e melhores propriedades físicas (estabilidade e homogeneidade) e ainda um risco reduzido de imunogenicidade, por meio da alteração das sequências de aminoácidos das regiões variáveis e constantes do anticorpo humanizado, IgG1 anti-recetor de IL-6, TOCILIZUMABE; e processos para a produção dessas composições farmacêuticas. Mais especificamente, a presente invenção tem por objeto:

[1] um anticorpo anti-recetor de IL-6 de qualquer um de:

(a) um anticorpo que contém uma região variável de cadeia pesada que compreende a sequência da SEQ ID NO: 20 (região variável de VP3-M73) e uma região

variável de cadeia leve que compreende a sequência da SEQ ID NO: 23 (região variável de VL3);

(b) um anticorpo que contém uma região variável de cadeia pesada que compreende a sequência da SEQ ID NO: 19 (região variável de VP4-M73) e uma região variável de cadeia leve que compreende a sequência da SEQ ID NO: 22 (região variável de VL1); e

(c) um anticorpo que contém uma região variável de cadeia pesada que compreende a sequência da SEQ ID NO: 21 (região variável de VP5-M83) e uma região variável de cadeia leve que compreende a sequência da SEQ ID NO: 24 (região variável de VL5);

[2] um anticorpo anti-recetor de IL-6 de qualquer um de:

(a) um anticorpo que contém uma cadeia pesada que compreende a sequência da SEQ ID NO: 26 (VP3-M73) e uma cadeia leve que compreende a sequência da SEQ ID NO: 29 (VL3);

(b) um anticorpo que contém uma cadeia pesada que compreende a sequência da SEQ ID NO: 25 (VP4-M73) e uma cadeia leve que compreende a sequência da SEQ ID NO: 28 (VL1); e

(c) um anticorpo que contém uma cadeia pesada que compreende a sequência da SEQ ID NO: 27 (VH5-M83) e uma cadeia leve que compreende a sequência da SEQ ID NO: 30 (VL5);

[3] um gene que codifica o anticorpo de [1] ou [2];

[4] um vetor que comporta o gene de [3];

[5] uma célula hospedeira que comporta o vetor de [4];

[6] um processo para a produção do anticorpo de [1] ou

[2] por meio da cultura da células hospedeira de [5]; e

[6] uma composição farmacêutica que compreende o anticorpo de [1] ou [2] ou um anticorpo produzido pelo processo de [6].

[Efeitos da invenção]

Os anticorpos humanizados IgG, anti-recetor de IL-6, obtidos de acordo com a descrição, melhoraram a eficácia e a farmacocinética; assim, podem exercer um efeito terapêutico prolongado com uma menor frequência de administração.

Breve descrição dos desenhos

A fig. 1 é uma lista de sítios de mutação que melhora a afinidade de TOCILIZUMABE para o recetor de IL-6. A sequência de PRDC2 de TOCILIZUMABE está ilustrada na SEQ ID NO: 81, a sequência de PRDC2 após mutação (linha superior) está ilustrada na SEQ ID NO: 82, a sequência de PRDC2 após mutação (linha inferior) está ilustrada na SEQ ID NO: 83; a sequência de RDC2P de TOCILIZUMABE está ilustrada na SEQ ID NO: 84, a sequência de PRDC3 após mutação (linha superior) está ilustrada na SEQ ID NO: 85, a sequência de PRDC3 após mutação (linha inferior) está ilustrada na SEQ ID NO: 86; a sequência de LRDC1 de TOCILIZUMABE está ilustrada na SEQ ID NO: 87, a sequência de LRDC1 após mutação (linha superior) está ilustrada na SEQ ID NO: 88; a sequência de LRDC1 após mutação (linha inferior) está ilustrada na SEQ ID NO: 89; a sequência de LRDC3 de TOCILIZUMABE está ilustrada na SEQ ID NO: 90; a sequência de LRDC3 após mutação (linha superior) está ilustrada na SEQ ID NO: 91; e a sequência de LRDC3 após mutação (linha inferior) está ilustrada na SEQ ID NO: 92.

A fig. 2 representa um gráfico que mostra as atividades de neutralização de TOCILIZUMABE w RDC-23 em BaF/gp130. A fig. 3 é uma lista de sítios de mutação que podem reduzir o ponto isoelétrico da região variável sem uma redução significativa da ligação de TOCILIZUMABEE ao recetor de IL-6. O asterisco, nos desenhos, represeta um sítio que não tem influência no ponto isoelétrico mas que está mutado para a conversão numa sequência humana. A sequência de PRE1 de TOCILIZUMABE está ilustrada na SEQ ID NO: 93; a sequência de PRE1, após mutação, está ilustrada na SEQ ID NO: 94; a sequência de PRDC1 de TOCILIZUMABE está ilustrada na SEQ ID NO: 95; a sequência de PRDC1, após mutação, está ilustrada na SEQ ID NO: 96; a sequência de PRE1 de TOCILIZUMABE está ilustrada na SEQ ID NO: 97; a sequência de PRE2, após mutação, está ilustrada na SEQ ID NO: 98; a sequência de PRDC2 de TOCILIZUMABE está ilustrada na SEQ ID NO: 81; a sequência de PRDC2, após mutação, está ilustrada na SEQ ID NO: 99; a sequência de PRE4 de TOCILIZUMABE está ilustrada na SEQ ID NO: 100; a sequência de PRE4, após mutação, está ilustrada na SEQ ID NO: 101; a sequência de LRE1 de TOCILIZUMABE está ilustrada na SEQ ID NO: 102; a sequência de PRE1, após mutação, está ilustrada na SEQ ID NO: 103; a sequência de LRDC1 de TOCILIZUMABE está ilustrada na SEQ ID NO: 87; a sequência de ÇRDC1, após mutação, está ilustrada na SEQ ID NO: 104; a sequência de LRE2 de TOCILIZUMABE está ilustrada na SEQ ID NO: 105; a sequência de LRE2, após mutação, está ilustrada na SEQ ID NO: 106; a sequência de LRDC2 de TOCILIZUMABE está ilustrada na SEQ ID NO: 107; a sequência de LRDC2, após mutação, está ilustrada na SEQ ID NO: 108 e 109; a sequência de LRE3 de TOCILIZUMABE está ilustrada na SEQ ID NO: 110; a sequência de LRE3, após mutação, está ilustrada na

SEQ ID NO: 111; a sequência de LRE4 de TOCILIZUMABE está ilustrada na SEQ ID NO: 112; e a sequência de LRE4, após mutação, está ilustrada na SEQ ID NO: 113.

A fig. 4 representa um gráfico que mostra as atividades de neutralização de TOCILIZUMABE e H53/L28 em BaF/gp130.

A fig. 5 representa um gráfico que mostra, em diversos momentos, a concentração no plasma de TOCILIZUMABE e H53/L28 em murganhos, depois da administração intravenosa.

A fig. 6 representa um gráfico que mostra, em diversos momentos, a concentração no plasma de TOCILIZUMABE e H53/L28 em murganhos, depois da administração subcutânea.

A fig. 6 representa uma ilustração esquemática que mostra que uma molécula de IgG se pode ligar novamente a outro antígeno, por dissociação de um antígeno, do tipo da membrana, no endossoma.

A fig. 8 representa uma lista dos sítios de mutação que conferem uma dependência do pH em relação à ligação de TOCILIZUMABE ao recetor de IL-6 (ligação a pH 7,4 e dissociação a pH 5,8). A sequência de PER1 de TOCILIZUMABE está ilustrada na SEQ ID NO: 93; a sequência de PRE1, após mutação, está ilustrada na SEQ ID NO: 114; a sequência de PRDC1 de TOCILIZUMABE está ilustrada na SEQ ID NO: 95; a sequência de PRDC1, após mutação, está ilustrada na SEQ ID NO: 115; a sequência de LRDC1 de TOCILIZUMABE está ilustrada na SEQ ID NO: 87; a sequência de ÇRDC1, após mutação, está ilustrada na SEQ ID NO: 116; a sequência de LRDC2 de TOCILIZUMABE está ilustrada na SEQ ID NO: 107; e a sequência de LRDC2, após mutação, está ilustrada na SEQ ID NO: 117.

A fig. 9 representa um gráfico que mostra as atividades de neutralização de TOCILIZUMABE e H3pI/L73 em BaF/gp130.

A fig. 10 representa um gráfico que mostra, em diversos momentos, a concentração no plasma de TOCILIZUMABE e H53pI/L73 em macacos cinomólogos, depois da administração intravenosa.

A fig. 11 representa um gráfico que mostra, em diversos momentos, a concentração no plasma de TOCILIZUMABE e H53pI/L73 em murganhos transgênicos do recetor de IL-6 humano, depois da administração intravenosa.

A fig. 12 representa um diagrama que mostra o resultado da avaliação da heterogeneidade do terminal C de TOCILIZUMABE, TOCILIZUMABEΔK E TOCILIZUMABEΔGK, por cromatografia de permuta catiónica.

A fig. 13 representa um diagrama que mostra o resultado da avaliação da heterogeneidade derivada da ligação de dissulfureto de TOCILIZUMABE-IgG1, TOCILIZUMABE-IgG2 e TOCILIZUMABE-SKSC por cromatografia de permuta catiónica.

A fig. 12 representa um diagrama que mostra as curvas de desnaturação de TOCILIZUMABE-IgG1, TOCILIZUMABE-IgG2 e TOCILIZUMABE-SKSC obtidas por calorimetria diferencial de varrimento (CDV) e o valor de Tm para cada domínio Fab.

A fig. 15 representa um gráfico que mostra, em diversos momentos, a concentração no plasma de TOCILIZUMABE-IgG1, TOCILIZUMABE-IgG2 e TOCILIZUMABE-SKSC em murganhos transgênicos de FcRn humano, depois da administração intravenosa.

A fig. 16 representa um gráfico que mostra as atividades de neutralização de TOCILIZUMABE, controlo e Fv5-M83 em BaF/gp130.

A fig. 17 representa um gráfico que mostra as atividades de neutralização de TOCILIZUMABE, Fv3-M73 e Fv4-M73 em BaF/gp130.

A fig. 18 representa um gráfico que mostra, em diversos momentos, as concentrações no plasma de TOCILIZUMABE, controlo, Fv3-M73, Fv4-M73 e Fv5-M83 em macacos cinomólogos, depois da administração intravenosa.

A fig. 19 representa um gráfico que mostra, em diversos momentos, da concentração de CRP para TOCILIZUMABE, controlo, Fv3-M73, Fv4-M73 ou Fv5-M83 em macacos cinomólogos, depois da administração intravenosa.

A fig. 20 representa um gráfico que mostra, em diversos momentos, a percentagem do recetor de IL-6 livre e solúvel em macacos cinomólogos, depois da administração intravenosa de TOCILIZUMABE, controlo, Fv3-M73, Fv4-M73 ou Fv5-M83.

A fig. 21 representa um gráfico que mostra os efeitos inibidores causados por TOCILIZUMABE e Fv4-M73 na produção de MCP-1 a partir de células sinoviais derivadas de doentes humanos com AR.

A fig. 22 representa um gráfico que mostra os efeitos inibidores causados por TOCILIZUMABE e Fv4-M73 na produção de FCEV a partir de células sinoviais derivadas de doentes humanos com AR.

Melhor prática para a realização da presente invenção

A presente invenção tem por objeto anticorpos, conforme reivindicado. A presente invenção também tem por objeto os polipéptidos de (a) a (f) que se seguem:

(a) um polipéptido que contém RDC1 que compreende a sequência da SEQ ID NO: 1 (RDC1 de VP4-M73), RDC2 que compreende a sequência da SEQ ID NO: 2 (RDC2 de VP4-

M73) e RDC3 que compreende a sequência da SEQ ID NO: 3 (RDC3 de VP4-M73);

(b) um polipéptido que contém RDC1 que compreende a sequência da SEQ ID NO: 4 (RDC1 de VP3-M73), RDC2 que compreende a sequência da SEQ ID NO: 5 (RDC2 de VP3-M73) e RDC3 que compreende a sequência da SEQ ID NO: 6 (RDC3 de VP3-M73);

(c) um polipéptido que contém RDC1 que compreende a sequência da SEQ ID NO: 7 (RDC1 de VP5-M83), RDC2 que compreende a sequência da SEQ ID NO: 8 (RDC2 de VP3-M83) e RDC3 que compreende a sequência da SEQ ID NO: 9 (RDC3 de VP5-M83);

(d) um polipéptido que contém RDC1 que compreende a sequência da SEQ ID NO: 10 (RDC1 de VL1), RDC2 que compreende a sequência da SEQ ID NO: 11 (RDC2 de VL1) e RDC3 que compreende a sequência da SEQ ID NO: 12 (RDC3 de VL1);

(e) um polipéptido que contém RDC1 que compreende a sequência da SEQ ID NO: 13 (RDC1 de VL1), RDC2 que compreende a sequência da SEQ ID NO: 14 (RDC2 de VL3) e RDC3 que compreende a sequência da SEQ ID NO: 15 (RDC3 de VL3); e

(f) um polipéptido que contém RDC1 que compreende a sequência da SEQ ID NO: 16 (RDC1 de VL5), RDC2 que compreende a sequência da SEQ ID NO: 17 (RDC2 de VL5) e RDC3 que compreende a sequência da SEQ ID NO: 18 (RDC3 de VL5);

Os polipéptidos aqui descritos não estão particularmente limitados; contudo, preferivelmente, são substâncias de ligação ao antigénio com uma atividade de ligação ao recetor humano de IL-6. Essas substâncias de ligação ao antigénio incluem, preferencialmente, por exemplo, regiões variáveis de cadeia pesada (VP) de um

anticorpo, regiões variáveis de cadeia leve (VL) de um anticorpo, cadeias pesadas de anticorpo, cadeias leves de anticorpo e anticorpos.

Dos polipéptidos anteriores de (a) a (f), os polipéptidos de (a) a (c) são os exemplos preferidos de regiões variáveis de cadeia pesada de anticorpos, enquanto os polipéptidos de (d) a (f) são os exemplos preferidos de regiões variáveis de cadeia leve de anticorpos.

Estas regiões variáveis podem ser utilizadas como uma porção de um anticorpo anti-recetor humano de IL-6. Os anticorpos anti-recetor humano de IL-6, no qual se utiliza a região variável, tem uma atividade de ligação superior, uma excelente farmacocinética, uma excelente segurança, imunogenicidade reduzida e/ou propriedades físico-químicas superiores. Na descrição, excelente farmacocinética ou melhoria da farmacocinética refere-se a qualquer de um de: diminuição da "clearance (CL)", aumento da "área sob a curva (ASC)", aumento do "tempo médio de permanência" e aumento do "semi-período de vida ($t_{1/2}$)", que são parâmetros farmacocinéticos calculados a partir da concentração no plasma ao longo do tempo, quando o anticorpo é administrado ao corpo. Aqui, propriedades físico-químicas superiores ou melhores propriedades físico-químicas refere-se, mas não se limita a melhor estabilidade, diminuição da heterogeneidade ou similar.

As regiões estruturais (RE) do anticorpo humano que se vão ligar às RDC seleccionam-se de modo que a RDC forme um sítio favorável à ligação do antigénio. As RE que se utilizam para as regiões variáveis, tal como se descrevem aqui, não estão particularmente limitadas e pode-se utilizar qualquer RE; contudo, prefere-se utilizar as RE

derivadas de seres humanos. É possível utilizar RE derivadas de seres humanos com uma sequência natural. Alternativamente, se necessário, pode-se introduzir uma substituição, uma eliminação, uma adição e/ou uma inserção de um ou mais desses aminoácidos na região estrutural com uma sequência natural de modo que a RDC forma um sítio adequado de ligação ao antígeno. As sequências mutantes da RE que têm uma propriedade desejada podem ser selecionadas, por exemplo, medindo e avaliando a atividade de ligação a um antígeno, por um anticorpo com uma RE com substituições de aminoácidos (Sato, K. et al., Cancer Res. (1993), 53, 851-856).

Contudo, pode-se substituir, eliminar, adicionar e/ou inserir um ou mais aminoácidos na sequência da RDC descrita antes. É preferível que uma sequência de RDC, após substituição, eliminação, adição e/ou inserção de um ou mais aminoácidos, tenha uma atividade equivalente à sequência de RDC antes da alteração, no que respeita à atividade de ligação, atividade de neutralização, estabilidade, imunogenicidade e/ou farmacocinética. O número de aminoácidos a ser substituído, eliminado, adicionado e/ou inserido não está particularmente limitado; contudo, é preferível três aminoácidos ou menos, mais preferencialmente dois aminoácidos e ainda mais preferencialmente um aminoácido por cada RDC.

Os processos para a substituição de um ou mais resíduos de aminoácidos, por outros aminoácidos de interesse, incluem, por exemplo, mutagênese dirigida ao sítio (Hashimoto-Gotoh, T, Mizuno, T, Ogasahara, Y, and Nakagawa, M. (1995) An oligodeoxyribonucleotide-directed dual amber method for site-directed mutagenesis. Gene 152, 271-275; Zoller, MJ e Smith, M. (1983) Oligonucleotide-

directed mutagenesis of DNA fragments cloned into M13 vectors. *Methods Enzymol.* 100, 468-500; Kramer, W, Drutsa, V, Jansen, HW, Kramer, B, Pflugfelder, M. e Fritz, HJ (1984) The gapped duplex DNA approach to oligonucleotide-directed mutation construction. *Nucleic Acids Res.* 12, 9441-9456; Kramer W. e Fritz HJ (1987) Oligonucleotide-directed construction of mutations via gapped duplex DNA *Methods. Enzymol.* 154, 350-367; Kunkel, TA (1985) Rapid and efficient site-specific mutagenesis without phenotypic selection. *Proc Natl Acad Sci E.U.A.* 82, 488-492). Este processo pode ser utilizado para substituir os aminoácidos desejados num anticorpo com outros aminoácidos de interesse. Além disso, os aminoácidos nas estruturas e nas RDC podem ser substituídos por outros aminoácidos apropriados utilizando técnicas de biblioteca, tal como arrastamento de estruturas (*Mol. Immunol.* 2007 Abr; 44(11): 3049-60) e reparação da RDC (US 2006/0122377).

A presente invenção também tem por objeto os anticorpos de (a) a (c) que se seguem:

- (a) um anticorpo que contém uma região variável de cadeia pesada que compreende RDC1 que compreende a sequência da SEQ ID NO: 1 (RDC1 de VP4-M73), RDC2 que compreende a sequência da SEQ ID NO: 2 (RDC2 de VP4-M73) e RDC3 que compreende a sequência da SEQ ID NO: 3 (RDC3 de VP4-M73) e uma região variável de cadeia leve que compreende a RDC1 que contém a sequência da SEQ ID NO: 10 (RDC1 de VL1), RDC2 que compreende a sequência da SEQ ID NO: 11 (RDC2 de VL1) e RDC3 que compreende a sequência da SEQ ID NO: 12 (RDC3 de VL1);
- (b) um anticorpo que contém uma região variável de cadeia pesada que compreende a RDC1 que compreende a sequência da SEQ ID NO: 4 (RDC1 de VP3-M73), RDC2 que

compreende a sequência da SEQ ID NO: 5 (RDC2 de VP3-M73) e RDC3 que compreende a sequência da SEQ ID NO: 6 (RDC3 de VP3-M73) e uma região variável de cadeia leve que compreende RDC1 que contém a sequência da SEQ ID NO: 13 (RDC1 de VL1), RDC2 que compreende a sequência da SEQ ID NO: 14 (RDC2 de VL3) e RDC3 que compreende a sequência da SEQ ID NO: 15 (RDC3 de VL3); e

(c) um anticorpo que contém uma região variável de cadeia pesada que compreende RDC1 que compreende a sequência da SEQ ID NO: 7 (RDC1 de VP5-M83), RDC2 que compreende a sequência da SEQ ID NO: 8 (RDC2 de VP5-M83) e RDC3 que compreende a sequência da SEQ ID NO: 9 (RDC3 de VP5-M73) e uma região variável de cadeia leve que compreende RDC1 que contém a sequência da SEQ ID NO: 16 (RDC1 de VL5), RDC2 que compreende a sequência da SEQ ID NO: 17 (RDC2 de VL5) e RDC3 que compreende a sequência da SEQ ID NO: 18 (RDC3 de VL5);

Os anticorpos descritos antes podem ser utilizados como anticorpos anti-recetor humano de IL-6 com uma atividade de ligação superior, excelente farmacocinética, excelente segurança, imunogenicidade reduzida e/ou propriedades físico-químicas superiores.

As regiões estruturais do anticorpo humano que se vão ligar às RDC, tal como se descreveu antes, selecionam-se de modo que a RDC forme um sítio favorável à ligação ao antigénio. As RE que se utilizam para as regiões variáveis da memória descritiva não estão particularmente limitadas e pode-se utilizar qualquer RE; contudo, prefere-se utilizar as RE derivadas de seres humanos. É possível utilizar RE derivadas de seres humanos com uma sequência natural. Alternativamente, se necessário, pode-se introduzir uma substituição, uma eliminação, uma adição e/ou uma inserção

de um ou mais desses aminoácidos na região estrutural com uma sequência natural de modo que a RDC forme um sítio adequado de ligação ao antígeno. As sequências mutantes das RE que têm uma propriedade desejada podem ser selecionadas, por exemplo, medindo e avaliando a atividade de ligação a um antígeno por um anticorpo com uma RE com substituições de aminoácidos (Sato, K. et al., Cancer Res. (1993), 53, 851-856).

Entretanto, a região constante a ser utilizada para um anticorpo aqui descrito não está particularmente limitada e pode-se utilizar qualquer região constante. As regiões constantes preferidas para serem utilizadas para os anticorpos aqui descritos incluem, por exemplo, regiões constantes derivadas de seres humanos (regiões constantes derivadas de IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, Cκ, Cλ e similar). Pode-se substituir, eliminar, adicionar e/ou inserir um ou mais aminoácidos nas regiões constantes derivadas de seres humanos. As regiões constantes de cadeia pesada, derivadas de seres humanos, preferidas, incluem, por exemplo, regiões constantes que contêm a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 31 (uma região constante de VP4-M73) e regiões constantes que contêm a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 32 (região constante de VP3-M73) e regiões constantes que contêm a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 33 (região constante de VP5-M73), enquanto as regiões constantes de cadeia leve derivadas de seres humanos incluem, por exemplo, regiões constantes que contêm a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 34 (VL1), regiões constantes que contêm a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 35 (VL3) e regiões constantes que contêm a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 36 (VL5).

Contudo, pode-se substituir, eliminar, adicionar e/ou inserir um ou mais aminoácidos na sequência da RDC descrita antes. É preferível que uma sequência de RDC, após substituição, eliminação, adição e/ou inserção de um ou mais aminoácidos, tenha uma atividade equivalente à sequência de RDC, antes da alteração, no que respeita à atividade de ligação, atividade de neutralização, estabilidade, imunogenicidade e/ou farmacocinética. O número de aminoácidos a ser substituído, eliminado, adicionado e/ou inserido não está particularmente limitado; contudo, é preferível três aminoácidos ou menos, mais preferencialmente dois aminoácidos e ainda mais preferencialmente um aminoácido por RDC.

Os aminoácidos podem também ser substituídos, eliminados, adicionados e/ou inseridos pelos processos descritos antes.

A presente invenção também tem por objeto as regiões variáveis de (a) a (f) que se seguem:

- (a) uma região variável de cadeia pesada que contém a sequência da SEQ ID NO: 19 (região variável de VP4-M73);
- (b) uma região variável de cadeia pesada que contém a sequência da SEQ ID NO: 20 (região variável de VP3-M73);
- (c) uma região variável de cadeia pesada que contém a sequência da SEQ ID NO: 21 (região variável de VP5-M83);
- (d) uma região variável de cadeia leve que contém a sequência da SEQ ID NO: 22 (região variável de VL1);
- (e) uma região variável de cadeia leve que contém a sequência da SEQ ID NO: 23 (região variável de VL3); e

(f) uma região variável de cadeia leve que contém a sequência da SEQ ID NO: 24 (região variável de VL5).

As regiões variáveis descritas antes podem ser utilizadas como parte de um anticorpo anti-recetor humano de IL-6. Os anticorpos anti-recetor humano de IL-6, nos quais se utilizam essas regiões variáveis têm uma atividade de ligação superior, uma excelente farmacocinética, excelente segurança, imunogenicidade reduzida e/ou propriedades físico-químicas superiores.

As regiões variáveis descritas antes podem também compreender substituições, eliminações, adições e/ou inserções de um ou mais aminoácidos (por exemplo, cinco aminoácidos ou menos, preferencialmente três aminoácidos ou menos). Os processos para a substituição de um ou mais resíduos de aminoácidos por outros aminoácidos de interesse, incluem, por exemplo, os processos descritos antes.

A presente invenção também tem por objeto polipéptidos que contêm as regiões variáveis descritas antes.

Além disso, a presente invenção tem por objeto os anticorpos de (a) a (c) que se seguem:

(a) um anticorpo que contém uma região variável de cadeia pesada que compreende a sequência da SEQ ID NO: 19 (região variável de VP4-M73) e uma região variável de cadeia leve que compreende a sequência da SEQ ID NO: 22 (região variável de VL1);

(b) um anticorpo que contém uma região variável de cadeia pesada que compreende a sequência da SEQ ID NO: 20 (região variável de VP3-M73) e uma região variável

de cadeia leve que compreende a sequência da SEQ ID NO: 23 (região variável de VL3); e

(c) um anticorpo que contém uma região variável de cadeia pesada que compreende a sequência da SEQ ID NO: 21 (região variável de VP5-M83) e uma região variável de cadeia leve que compreende a sequência da SEQ ID NO: 24 (região variável de VL5).

As regiões variáveis descritas antes podem ser utilizadas como parte de um anticorpo anti-recetor humano de IL-6. Os anticorpos anti-recetor humano de IL-6, no qual se utilizam estas regiões variáveis, têm uma atividade de ligação superior, uma excelente farmacocinética, excelente segurança, imunogenicidade reduzida e/ou propriedades físicas superiores.

As regiões variáveis descritas antes podem também compreender substituições, eliminações, adições e/ou inserções de um ou mais aminoácidos (por exemplo, cinco aminoácidos ou menos, preferencialmente três aminoácidos ou menos). Os processos para a substituição de um ou mais resíduos de aminoácidos, por outros aminoácidos de interesse, incluem, por exemplo, os processos descritos antes.

Entretanto, a região constante a ser utilizada para um anticorpo aqui descrito não está particularmente limitada e pode-se utilizar qualquer região constante. As regiões constantes preferidas para serem utilizadas para os anticorpos da presente invenção incluem, por exemplo, regiões constantes derivadas de seres humanos (regiões constantes derivadas de IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, cadeia κ , cadeia λ e similar). Pode-se substituir, eliminar, adicionar e/ou inserir um ou mais aminoácidos nas regiões

constantes derivadas de seres humanos. As regiões constantes preferidas, de cadeia pesada, derivadas de seres humanos, incluem, por exemplo, regiões constantes que contêm a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 31 (região constante de VP4-M73), regiões constantes que contêm a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 32 (região constante de VP3-M73) e regiões constantes que contêm a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 33 (região constante de VP5-M73), enquanto as regiões constantes de cadeia leve derivadas de seres humanos incluem, por exemplo, regiões constantes que contêm a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 34 (VL1), regiões constantes que contêm a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 35 (VL3) e regiões constantes que contêm a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 36 (VL5).

A presente invenção também tem por objeto as cadeias pesada e leves de (a) a (f) que se seguem:

- (a) uma cadeia pesada que contém a sequência da SEQ ID NO: 25 (VP4-M73);
- (b) uma cadeia pesada que contém a sequência da SEQ ID NO: 26 (VP3-M73);
- (c) uma cadeia pesada que contém a sequência da SEQ ID NO: 27 (VP5-M83);
- (d) uma cadeia leve que contém a sequência da SEQ ID NO: 28 (VL1);
- (e) uma cadeia leve que contém a sequência da SEQ ID NO: 29 (VL3); e
- (f) uma cadeia leve que contém a sequência da SEQ ID NO: 30 (VL5).

As cadeias, pesada e leve, descritas antes, podem ser utilizadas como parte de um anticorpo anti-recetor humano de IL-6. Os anticorpos anti-recetor humano de IL-6, nos

quais se utilizam estas cadeias, pesada e leve, têm uma atividade de ligação superior, uma excelente farmacocinética, excelente segurança, imunogenicidade reduzida e/ou propriedades físico-químicas superiores.

As cadeias pesadas e leves descritas antes podem também compreender substituições, eliminações, adições e/ou inserções de um ou mais aminoácidos (por exemplo, dez aminoácidos ou menos, preferencialmente cinco aminoácidos ou menos e, mais preferencialmente três aminoácidos ou menos). Os processos para a substituição de um ou mais resíduos de aminoácidos, por outros aminoácidos de interesse incluem, por exemplo, os processos descritos antes.

As substituições, eliminações, adições e/ou inserções de um ou mais aminoácidos podem ser realizadas para as regiões variáveis, regiões constantes ou ambas.

A presente invenção também tem por objeto os anticorpos de (a) a (c) que se seguem:

- (a) um anticorpo que contém uma cadeia pesada que compreende a sequência da SEQ ID NO: 25 (VP4-M73) e uma cadeia leve que compreende a sequência da SEQ ID NO: 28 (VL1);
- (b) um anticorpo que contém uma cadeia pesada que compreende a sequência da SEQ ID NO: 26 (VP3-M73) e uma cadeia leve que compreende a sequência da SEQ ID NO: 29 (VL3); e
- (c) um anticorpo que contém uma cadeia pesada que compreende a sequência da SEQ ID NO: 27 (VH5-M83) e uma cadeia leve que compreende a sequência da SEQ ID NO: 30 (VL5).

Os anticorpos descritos antes são anticorpos anti-recetor humano de IL-6 com uma atividade de ligação superior, excelente farmacocinética, excelente segurança, imunogenicidade reduzida e/ou propriedades físico-químicas superiores.

Os anticorpos descritos antes podem também compreender substituições, eliminações, adições e/ou inserções de um ou mais aminoácidos (por exemplo, 20 aminoácidos ou menos, preferencialmente dez aminoácidos ou menos e, mais preferencialmente, cinco aminoácidos ou menos). Os processos para a substituição de um ou mais resíduos de aminoácidos, por outros aminoácidos de interesse, incluem, por exemplo, os processos descritos antes.

As substituições, eliminações, adições e/ou inserções de um ou mais aminoácidos podem ser realizadas para as regiões variáveis, as regiões constantes ou ambas.

Os anticorpos aqui descritos são, preferencialmente, anticorpos humanizados.

Os anticorpos humanizados são também referidos como anticorpos humanos com uma outra forma. Esse anticorpo humanizado pode obter-se por enxerto de uma região de determinação de complementaridade (RDC), derivada de um mamífero não humano, na RDC de um anticorpo humano. As técnicas convencionais de recombinação genética, para a preparação desses anticorpos, também são conhecidas (ver o pedido de patente europeia nº EP 125023; e WO 96/02576).

Especificamente, por exemplo, sintetiza-se uma sequência de ADN concebida de tal modo que se liga uma RDC de interesse e uma região estrutural (RE) de interesse, por

RCP, utilizando vários oligonucleótidos preparados para terem porções de sobreposição com as extremidades, tanto das RDC como das RE, como iniciadores (ver o processo descrito em WO 98/13388). Obtém-se um anticorpo humanizado por: ligação do ADN resultante a um ADN que codifica uma região constante de um anticorpo humano ou uma região constante de um anticorpo humano modificado; inserção deste num vetor de expressão; e introdução deste num hospedeiro para produzir o anticorpo (ver o pedido de patente europeia nº EP 239400 e a publicação do pedido de patente internacional No. WO 96/02576).

As regiões estruturais do anticorpo humano que se vão ligar às RDC selecionam-se de modo que a RDC forme um sítio favorável de ligação ao antigénio. Se necessário, a substituição, eliminação, adição e/ou inserção podem ser introduzidas na região estrutural de uma região variável de um anticorpo.

Uma região constante de um anticorpo humano ou uma região constante alterada de um anticorpo humano, em que um ou mais aminoácidos tenham sido substituídos, eliminados, adicionados e/ou inseridos numa região constante de um anticorpo humano, pode ser utilizada como a região constante de um anticorpo humanizado.

Por exemplo, C γ 1, C γ 2, C γ 3, C γ 4, C μ , C δ , C α 1, C α 2 e C ϵ podem ser utilizados para a cadeia P e C κ e C λ podem ser utilizados para a cadeia L. A sequência de aminoácidos de C κ está ilustrada na SEQ ID NO: 38 e a sequência de nucleótidos que codifica esta sequência de aminoácidos está ilustrada na SEQ ID NO: 37. A sequência de aminoácidos de C γ 1 está ilustrada na SEQ ID NO: 40 e a sequência de nucleótidos que codifica esta sequência de aminoácidos está

ilustrada na SEQ ID NO: 39. A sequência de aminoácidos de Cy2 está ilustrada na SEQ ID NO: 42 e a sequência de nucleótidos que codifica esta sequência de aminoácidos está ilustrada na SEQ ID NO: 41. A sequência de aminoácidos de Cy4 está ilustrada na SEQ ID NO: 44 e a sequência de nucleótidos que codifica esta sequência de aminoácidos está ilustrada na SEQ ID NO: 43.

Além disso, as regiões C do anticorpo humano podem ser modificadas para aumentar a estabilidade do anticorpo ou a estabilidade de produção do anticorpo. Os anticorpos humanos, de qualquer isotipo, tal como IgG, IgM, IgA, IgE ou IgD podem ser utilizados na humanização dos anticorpos; contudo, utiliza-se aqui, preferencialmente, IgG.

IgG1, IgG2, IgG3, IgG4 ou similares podem ser utilizadas como IgG.

Os aminoácidos na região variável (por exemplo RDC e RE) e a região constante de um anticorpo humanizado podem ser eliminados, adicionados, inseridos e/ou substituídos por aminoácidos, após a preparação. Os anticorpos aqui descritos incluem também esses anticorpos humanizados que contêm substituições de aminoácidos e similares.

Os anticorpos aqui descritos incluem não apenas anticorpos bivalentes como os representados por IgG, mas também anticorpos monovalentes e anticorpos multivalentes, como os representados por IgM, desde que tenham atividade de ligação ao recetor de IL-6 e/ou atividade de neutralização. Os anticorpos multivalentes aqui descritos incluem anticorpos multivalentes cujos sítios de ligação ao antigénio são todos idênticos e anticorpos multivalentes nos quais todos ou alguns dos sítios de ligação dos

antigénios são diferentes. Os anticorpos aqui descritos incluem não só moléculas completas de anticorpo, mas também minicorpos e os seus produtos modificados, desde que se liguem à proteína do recetor de IL-6.

Os minicorpos são anticorpos que compreendem fragmentos de anticorpos a que falta uma porção de um anticorpo inteiro (por exemplo, IgG inteiro ou similar) e não estão particularmente limitados desde que tenham atividade de ligação ao recetor de IL-6 e/ou atividade de neutralização e que compreendem um fragmento de anticorpo a que falta uma porção de um anticorpo inteiro (por exemplo, IgG inteiro ou similar). Os minicorpos aqui descritos não estão particularmente limitados, desde que contenham uma porção de um anticorpo completo. Contudo, os minicorpos compreendem, preferencialmente, VP ou VL e, particularmente preferido, contêm tanto VP como VL. Outros minicorpos preferidos aqui descritos incluem, por exemplo, minicorpos que contêm RDC de anticorpos. Os minicorpos podem conter todas ou algumas das seis RDC de um anticorpo.

Os minicorpos aqui descritos têm, preferencialmente, um peso molecular menor do que os anticorpos inteiros. Contudo, os minicorpos podem formar multímeros, por exemplo, dímeros, trímeros ou tetrâmeros e assim o seu peso molecular é algumas vezes superior ao dos anticorpos inteiros.

Especificamente, os fragmentos de anticorpos incluem Fab, Fab', F(ab')₂ e Fv. No entanto, os minicorpos incluem, por exemplo, Fab, Fab', F(ab')₂, Fv, scFv (Fv de cadeia simples), diacorpos e sc(Fv)₂ ((Fv)₂ de cadeia simples). Os multímeros (por exemplo, dímeros, trímeros, tetrâmeros e

polímeros) destes anticorpos também estão incluídos nos minicorpos aqui descritos.

Os fragmentos de anticorpos podem obter-se, por exemplo, por tratamento de anticorpos com enzimas, para produzir fragmentos de anticorpos. As enzimas conhecidas por gerar fragmentos de anticorpos incluem, por exemplo, papaína, pepsina e plasmina. Alternativamente, um gene que codifica esse fragmento de anticorpo pode ser construído, introduzido num vetor de expressão e ser expresso em células hospedeiras apropriadas (ver, por exemplo Co, M.S. et al., J. Immunol. (1994) 152, 2968-2976; Better, M. & Horwitz, A. H. Methods in Enzymology (1989) 178, 476-496; Pluckthun, A. & Skerra, A. Methods in Enzymology (1989) 178, 476-496; Lamoyi, E., Methods in Enzymology (1989) 121, 652-663; Rousseaux, J. et al., Methods in Enzymology (1989) 121, 663-669; Bird, R. E. et al., TIBTECH (1991) 9, 132-137).

As enzimas digestivas clivam, em sítios específicos de um fragmento de anticorpo, originando fragmentos de anticorpos de estruturas específicas que se mostram a seguir. Podem aplicar-se técnicas de engenharia genética a esses fragmentos de anticorpos obtidos enzimaticamente para eliminar uma porção arbitrária do anticorpo.

Os fragmentos de anticorpo obtidos por meio da utilização das enzimas digestivas anteriores, são os seguintes.

Digestão de papaína: F(ab)₂ ou Fab

Digestão de pepsina: F(ab')₂ ou Fab'

Digestão de plasmina: Facb

Os minicorpos aqui descritos incluem fragmentos de anticorpos a que falta uma região arbitrária, desde que tenham atividade de ligação ao recetor de IL-6 e/ou atividade de neutralização.

"Diacorpo" refere-se a um fragmento de anticorpo bivalente construído pela fusão de genes (Holliger P et al., 1993, Proc. Natl. Acad. Sci., EUA 90; 6444-6448; EP 404 097; WO 93/11161, etc). Diacorpos são dímeros compostos por duas cadeias de polipéptidos. Em cada uma das cadeias de polipéptido que formam um dímero, uma VL e uma VP estão geralmente ligadas por um ligante na mesma cadeia. No geral, um ligante num diacorpo é suficientemente curto de tal modo que VL e VP não se podem ligar uma à outra. Especificamente, o número de resíduos de aminoácidos que constituem o ligante é, por exemplo, de cerca de cinco resíduos. Assim, a VL e a VP, codificadas no mesmo polipéptido, não pode formar um fragmento de região variável de cadeia única e formarão um dímero com outro fragmento de região variável de cadeia única. Como resultado, o diacorpo tem dois sítios de ligação de antigénios.

Os anticorpos ScFv são polipéptidos de cadeia única produzidos por ligação de VP e VL, por via de um ligante ou similar (Huston, J. S. et al., Proc. Natl. Acad. Sci., E.U.A. (1988) 85, 5879-5883; Pluckthun "The Pharmacology of Monoclonal Antibodies" vol. 113, eds., Resenbourg and Moore, Springer Verlag, New York, p. 269-315, (1994)). A região V de cadeia P e a região V de cadeia L de scFv podem derivar de qualquer anticorpo aqui descrito. O ligante de péptido para a ligação das regiões V não está particularmente limitado. Por exemplo, pode-se utilizar, como ligante, um péptido arbitrário de cadeia única contendo cerca de três a

25 resíduos. Especificamente, é possível utilizar os ligantes de péptido descritos a seguir ou similares.

As regiões V das duas cadeias podem ser ligadas, por exemplo, por RCP, tal como descrito antes. Em primeiro lugar, utiliza-se, como matriz, um ADN que codifica a sequência completa de aminoácidos ou uma sequência parcial desejada de aminoácidos de um dos ADN ilustrados a seguir, para ligar as regiões V por RCP:

uma sequência de ADN que codifica uma região V de cadeia P ou uma cadeia P de um anticorpo e
uma sequência de ADN que codifica uma região V de cadeia L ou uma cadeia L de um anticorpo.

Os ADN que codificam a região V de uma cadeia P ou de uma cadeia L são ampliados por RCP utilizando um par de iniciadores contendo as sequências correspondentes das duas extremidades do ADN a ser amplificado. Depois, prepara-se um ADN que codifica a porção de ligante de péptido. O ADN que codifica o ligante do péptido também pode ser sintetizado por RCP. Adiciona-se uma sequência de nucleótidos que pode ser utilizada para ligar os produtos de amplificação da região V, sintetizados separadamente, à extremidade 5' dos iniciadores a ser utilizados. Depois, realiza-se uma RCP utilizando cada um dos ADN em [ADN de região V de cadeia P]-[ADN do ligante de péptido]-[ADN de região V de cadeia L] e junção dos iniciadores por RCP.

Os iniciadores conjugados por RCP contêm uma combinação de um iniciador que hibrida com a extremidade 5' do [ADN de região V de cadeia P] e um iniciador que hibrida com a extremidade 3' do [ADN de região V de cadeia L]. Por outras palavras, os iniciadores conjugados por RCP são um

conjunto de iniciadores que podem ser utilizados para amplificar ADN que codificam a sequência de comprimento completo do scFv a ser sintetizado. Entretanto, adicionam-se as sequências de ácidos nucleicos que podem ser utilizadas para ligar cada um dos ADN da região V ao [ADN do ligante de péptido]. Depois, estes ADN ligam-se e depois o scFv completo é por fim gerado como um produto de amplificação, utilizando a junção dos iniciadores por RCP. Uma vez gerados os ADN que codificam scFv, os vetores de expressão que contêm estes ADN e as células recombinantes transformados com estes vetores de expressão podem ser obtidos por processos convencionais. Depois, os scFv podem ser obtidos através da expressão dos ADN que codificam scFv, por meio de cultura das células recombinantes resultantes.

A ordem pela qual se ligam VP e VL não está particularmente limitada e podem estar arrançados por qualquer ordem. A seguir listam-se exemplos de arranjos.

[VP] ligante [VL]

[VL] ligante [VP]

O sc(Fv)₂ é um minicorpo de cadeia única produzido pela ligação de duas VP e duas VL, utilizando ligantes e similares (Hudson et al., 1999, J Immunol. Methods 231: 177-189). O sc(Fv)₂ pode ser produzido, por exemplo, por ligação de scFv, utilizando um ligante.

Preferencialmente, as duas VP e as duas VL de um anticorpo são arrançados pela seguinte ordem VP, VL, VP e VL ([VP] ligante [VL] ligante [VP] ligante [VL]) a partir do terminal N do polipéptido de cadeia única; contudo, a

ordem das duas VP e das duas VL não está limitada ao arranjo anterior e podem estar arranjadas por qualquer ordem. A seguir listam-se exemplos dos arranjos.

[VL] ligante [VP] ligante [VP] ligante [VL]
[VP] ligante [VL] ligante [VL] ligante [VP]
[VP] ligante [VP] ligante [VL] ligante [VL]
[VL] ligante [VL] ligante [VP] ligante [VP]
[VL] ligante [VP] ligante [VL] ligante [VP]

A sequência de aminoácidos de VP ou de VL do minicorpo contém substituições, eliminações, adições e/ou inserções. Além disso, desde que VP e VL tenham atividade de ligação ao antígeno, quando são conjugadas, pode-se eliminar uma porção ou podem adicionar-se outros polipéptidos. Além disso, as regiões variáveis podem ser quimerizadas ou humanizadas.

Na descrição, os ligantes que podem ser utilizados para ligar as regiões variáveis do anticorpo incluem ligantes arbitrários de péptidos que podem ser introduzidos por engenharia genética e ligantes sintéticos, por exemplo, os ligantes descritos em Protein Engineering, (1996) 9(3), 299-305.

Os ligantes preferidos nesta memória descritiva são ligantes de péptidos. O comprimento dos ligantes de péptidos não está particularmente limitado e os especialistas na matéria podem selecionar apropriadamente o comprimento, de acordo com a finalidade. O comprimento típico é de 100 aminoácidos, preferencialmente de 3 a 50 aminoácidos, mais preferencialmente, 5 a 30 aminoácidos, sendo particularmente preferível 12 a 18 aminoácidos (por exemplo, 15 aminoácidos).

Por exemplo, as sequências de aminoácidos para os ligantes de péptidos incluem as sequências que se seguem:

Ser
Gli·Ser
Gli·Gli·Ser
Ser Gli·Gli
Gli·Gli·Gli·Ser (SEQ ID NO: 45)
Ser Gli·Gli·Gli·(SEQ ID NO: 46)
Gli·Gli·Gli·Gli Ser (SEQ ID NO: 47)
Ser Gli·Gli·Gli·Gli (SEQ ID NO: 48)
Gli·Gli·Gli·Gli Gli Ser (SEQ ID NO: 49)
Ser Gli·Gli·Gli·Gli Gli (SEQ ID NO: 50)
Gli·Gli·Gli·Gli Gli Gli Ser (SEQ ID NO: 51)
Ser Gli·Gli·Gli·Gli Gli Gli (SEQ ID NO: 52)
(Gli·Gli·Gli·Gli Ser [SEQ ID NO: 47])n
(Ser Gli·Gli·Gli·Gli [SEQ ID NO: 48])n

em que n representa um número inteiro de 1 ou mais.

As sequências de aminoácidos dos ligantes de péptidos podem ser selecionadas apropriadamente pelos especialistas na matéria, de acordo com a finalidade. Por exemplo, o "n" anterior, que determina o comprimento do ligante do péptido, é normalmente um a cinco, preferencialmente de um a três e, mais preferencialmente, de um a dois.

Os ligantes sintéticos (agentes químicos de reticulação) incluem agentes de reticulação normalmente utilizados para reticular péptidos, por exemplo, N-hidroxisuccinimida (NHS), suberato de di-succinimidilo (DSS), suberato de bis(sulfosuccinimidilo) (BS3), ditiobis(propionato de succinimidilo) (DSP), ditiobis(propionato de sulfo-succinimidilo) (DTSSP), bis(succinimidil-succinato)

de etileno-glicol (EGS), bis(sulfo-succinimidil-succinato) de etileno-glicol (sulfo-EGS), tartrato de disuccinimidilo (DST), tartrato de disulfo-succinimidilo (sulfo-DST), bis[2-(succinimido-oxicarboniloxi)etil]sulfona (BSOCOES) e bis[2-(sulfo-succinimido-oxicarboniloxi)etil]sulfona (sulfo-BSOCOES). Estes agentes de reticulação estão comercialmente disponíveis.

Em geral, são necessários três ligantes para ligar quatro regiões variáveis de anticorpo. Estes múltiplos ligantes podem ser ligantes iguais ou diferentes.

Os anticorpos aqui descritos também incluem anticorpos em que um ou mais resíduos de aminoácidos tenham sido adicionados à sequência de aminoácidos de um anticorpo aqui descrito.

Além disso, os anticorpos aqui descritos também incluem proteínas de fusão em que o anticorpo descrito antes está fundido com outro péptido ou proteína. A proteína de fusão pode ser preparada por ligação de um polinucleótido que codifica um anticorpo aqui descrito e um polinucleótido que codifica outro péptido ou polipéptido enquadrado, introduzindo este num vetor de expressão e realizando a sua expressão num hospedeiro. Podem utilizar-se técnicas conhecidas dos especialistas na matéria. O péptido ou o polipéptido a ser fundido com um anticorpo aqui descrito pode ser um péptido conhecido, por exemplo, FLAG (Hopp, T. P. et al., *BioTechnology* 6, 1204-1210 (1988)), 6x His que consiste em seis resíduos de His (histidina), 10x His, hemaglutinina da gripe (HA), fragmento humano de c-mic, fragmento de VSV-GP, fragmento de p18VIH, marcador de T7, marcador de VHS, marcador de E, fragmento do antígeno de SV40 T, marcador de Ick,

fragmento de α -tubulina, marcador de B e fragmento de proteína C. Os polipéptidos que vão ser fundidos com os anticorpos aqui descritos incluem, por exemplo, GST (glutathione-S-transferase), HA (hemaglutinina da gripe), região constante de imunoglobulina, β -galactosidase e PLM (proteína de ligação a maltose). Os polinucleótidos disponíveis comercialmente, que codificam estes péptidos ou polipéptidos podem fundir-se com um polinucleótido que codifica um anticorpo aqui descrito. Pode-se preparar um polipéptido de fusão por meio da expressão do polinucleótido de fusão assim preparado.

Além disso, os anticorpos aqui descritos também podem ser anticorpos conjugados ligados a várias moléculas tais como polímeros, incluindo polietileno-glicol (PEG) e ácido hialurónico; substâncias radioativas; substâncias fluorescentes; substâncias luminescentes; enzimas; e toxinas. Esses anticorpos conjugados podem ser obtidos por meio de modificações químicas dos anticorpos obtidos. Os processos para a modificação dos anticorpos já foram estabelecidos na técnica (ver, por exemplo, US 5 057 313 e US 5 156 840). Os "anticorpos" aqui descritos também incluem esses anticorpos conjugados.

Além disso, os anticorpos aqui descritos incluem anticorpos que têm as cadeias de açúcar alteradas.

Além disso, os anticorpos utilizados na descrição podem ser anticorpos bi-específicos. Anticorpo bi-específico refere-se a um anticorpo que tem regiões variáveis que reconhecem epítomos diferentes, na mesma molécula de anticorpo. Um anticorpo bi-específico aqui descrito pode ser um anticorpo bi-específico que reconhece diferentes epítomos na molécula de recetor de IL-6 ou um

anticorpo bi-específico em que um dos sítios de ligação ao antigénio reconhece o recetor de IL-6 e o outro sítio de ligação ao antigénio reconhece outra substância. Exemplos de antigénios que se ligam ao outro sítio de ligação ao antigénio, de um anticorpo bi-específico contém um anticorpo de reconhecimento do recetor de IL-6 aqui descrito incluem IL-6, FNT α , R1FNT, R2FNT, CD80, CD86, CD28, CD20, CD19, IL-1 α , IL- β , IL-1R, RANKL, RANK, IL-17, IL-17R, IL-23, IL-23R, IL-15, IL-15R, BliS, linfotóxina α , linfotóxina β , ligando de LIGHT, LIGHT, VL-4, CD25, IL-12, IL-12R, CD40, CD40L, BAFF, CD52, CD22, IL-32, IL-21, IL-21R, FEC-GM, RFLC-GM, FEC-M, RFLC-M, IFN-alfa, FCEV, RFCEV, FCE, RFCE, RQC5 (recetor de quimiocina do tipo 5), APRIL e RAPRIL.

Os processos para a produção de anticorpos bi-específicos são conhecidos. Os anticorpos bi-específicos podem ser preparados, por exemplo, por ligação de dois tipos de anticorpos que reconhecem antigénios diferentes. Os anticorpos que se pretendem ligar podem ser metade de uma molécula, cada uma contendo uma cadeia P e uma cadeia L ou um quarto de molécula contendo apenas uma cadeia P. Alternativamente, as células de fusão que produzem anticorpos bi-específicos podem ser preparadas por fusão de hibridomas que produzem diferentes anticorpos monoclonais. Além disso, os anticorpos bi-específicos podem ser produzidos por técnicas de engenharia genética.

Tal como se descreve a seguir, os anticorpos aqui descritos podem diferir na sequência de aminoácidos, no peso molecular, no ponto isoelétrico, na presença/ausência de cadeias de açúcar e na conformação, dependendo do processo de purificação ou a célula ou o hospedeiro utilizados para produzir os anticorpos. Contudo, desde que o anticorpo obtido seja funcionalmente equivalente a um

anticorpo aqui descrito, estará incluído na presente descrição. Por exemplo, quando um anticorpo aqui descrito é expresso em células procarióticas, por exemplo, *Escherichia coli*, adiciona-se um resíduo de metionina ao terminal N da sequência de aminoácidos do anticorpo original. Esses anticorpos também estão incluídos nos anticorpos aqui descritos.

Os polipéptidos dos anticorpos anti-recetor de IL-6 e tal como se descreve aqui, podem ser produzidos por processos conhecidos dos especialistas na matéria.

Um anticorpo anti-recetor de IL-6 pode ser preparado, por exemplo, por técnicas de recombinação genética conhecidas dos especialistas na matéria, com base na sequência do anticorpo anti-recetor de IL-6 obtido. Especificamente, pode-se preparar um anticorpo anti-recetor de IL-6 por construção de um polipéptido que codifica o anticorpo com base na sequência de um anticorpo que reconhece o recetor de IL-6, inserindo o polinucleótido num vector de expressão e depois expressando-o numa célula hospedeira apropriada, (ver, por exemplo, Co, M. S. et al., J. Immunol. (1994) 152, 2968-2976; Better, M. e Horwitz, A. H., Methods Enzymol. (1989) 178, 476-496; Pluckthun, A. e Skerra, A., Methods Enzymol. (1989) 178, 497-515; Lamoyi, E., Methods Enzymol. (1986) 121, 652-663; Rousseaux, J. et al., Methods Enzymol. (1986) 121, 663-669; Bird, R. E. e Walker, B. W., Trends Biotechnol. (1991), 9, 132-137).

Assim, a presente invenção tem por objeto processos que produzem (i) um polipéptido aqui descrito ou (ii) um polipéptido codificado por um gene que codifica o polipéptido aqui descrito, em que os processos compreendem a etapa de cultura de uma célula hospedeira que compreende

um vetor no qual se introduziu um polinucleótido que codifica o polipéptido aqui descrito.

Mais especificamente, a presente invenção tem por objeto processos que produzem um polipéptido aqui descrito, que compreende as etapas de:

- (a) cultura de uma célula hospedeira que compreende um vetor no qual se introduz um gene que codifica o polipéptido aqui descrito; e
- (b) a obtenção do polipéptido codificado pelo gene.

Exemplos do vetor incluem vetores do tipo M13, vetores do tipo pUC, pBR322, pBluescript e pCR-Script. Alternativamente, quando o objetivo é sub-clonar e excisar o ADNc, outros exemplos do vetor, para além dos descritos antes, incluem pGEM-T, pDIRECT e pT7. Os vetores de expressão são particularmente úteis para a produção dos anticorpos aqui descritos. Por exemplo, quando se utiliza o vetor de expressão para a expressão em *E. coli*, o vetor deve ter características que permitam a sua amplificação em *E. coli*. Além disso, quando o hospedeiro é *E. coli*, tal como JM109, DH5 α , HB101 ou XL1-Blue, é essencial que o vetor comporte um promotor que permita a sua expressão eficiente em *E. coli*, por exemplo, o promotor de lacZ (Ward et al., Nature (1989) 341, 544-546; FASEB J. (1992) 6, 2422-2427), o promotor de araB (Better et al., Science (1988) 240, 1041-1043), o promotor de T7 ou similar. Esse vetor inclui pGEX-5X-1 (Pharmacia), "QIAexpress system" (Quiagen), pEGFP, e pET (neste caso, o hospedeiro é preferencialmente BL21 que expressa polimerase de ARN de T7), para além dos descritos antes.

~

Além disso, os vetores de expressão dos plasmídeos podem conter sequências de sinal para a secreção do anticorpo. Como sequência de sinal para a secreção do anticorpo, pode-se utilizar a sequência de sinal *pelB* (Lei, S. P. et al., J. Bacteriol. (1987) 169, 4379) para a produção no periplasma de *E. coli*. Os vetores podem ser introduzidos em células hospedeiras, por exemplo, por processos de cloreto de cálcio ou eletroporação.

Para além dos vetores para *E. coli*, os vetores para a produção dos anticorpos aqui descritos incluem, por exemplo, vetores de expressão derivados de mamíferos (por exemplo, *pcADN3* (Invitrogen), *pEF-BOS* (Nucleic Acids. Res. (1990) 18(17), p5322), *pEF* e *pCDM8*), vetores de expressão derivados de células de insetos (por exemplo, o "sistema de expressão de baculovírus *Bac-a-BAC*" (Gibco-BRL) e *pBacPAKB*), vetores de expressão derivados de plantas (por exemplo, *pMH1* e *pMH2*), vetores de expressão derivados de vírus de animais (por exemplo, *pHSV*, *pMV* e *pAdexLcw*), vetores de expressão derivados de retrovírus (por exemplo, *pZIPneo*), vetores de expressão derivados de levedura (por exemplo, "estojo de expressão de *Pichia*" (Invitrogen), *pNV11* e *SP-Q01*) e vetores de expressão derivados de *Bacillus subtilis* (por exemplo, *pPL608* e *pKTH50*).

Quando se utiliza o vetor de expressão de plasmídeo, para a expressão em células de animais, tais como células OHC, COS e NIH3T3, tem que haver um promotor para a expressão nessas células, por exemplo, o promotor de SV40 (Mulligan et al., Nature (1979) 277, 108), promotor de MMLV-LTR, promotor de *EF1 α* (Mizushima et al., Nucleic Acids Res. (1990) 18, 5322) ou promotor de CMV. É ainda mais preferível se o vetor tiver um gene para a selecção das células transformadas (por exemplo, um gene de resistência

ao fármaco que permite a distinção por meio de um agente (neomicina, G418 ou similar). Vectores com estas características incluem, por exemplo, pMAM, pDR2, pBK-RSV, pHK-CMV, pOPRSV e pOP 13.

Além disso, quando o objetivo é expressar de forma estável genes e amplificar um certo número de cópias de genes nas células, pode-se utilizar um processo no qual as células de OHC, deficientes na via de síntese de ácidos nucleicos, são introduzidas com um vetor com um gene de DHFR, que compensa a deficiência (por exemplo, pSV2-dhfr ("Molecular Cloning 2ª edição" Cold Spring Harbor Laboratory Press, (1989))) e o vetor é amplificado utilizando metotrexato (MTX). Além disso, quando o objetivo é a expressão temporária dos genes, pode-se utilizar um processo em que as células de COS, comportando um gene que expressa o antigénio SV40 T no seu cromossoma, são transformadas com um vetor que comporta uma origem de replicação de SV40 (pcD e similares). É possível utilizar origens de replicação derivadas de vírus de políoma, adenovírus, vírus de papiloma de bovino (VPB) e similares. Além disso, para amplificar o número de cópias de genes nas linhas de células hospedeiras, os vetores de expressão podem conter, como marcador de seleção, o gene de aminoglicósido-transferase (APH), o gene de timidina-cinase (TC), o gene de xantina-guanina-fosforibosiltransferase (Ecogpt) de *E. coli*, gene de di-hidrofolato-redutase (dhfr) e similares.

Os anticorpos resultantes aqui descritos podem ser isolados a partir das células hospedeiras ou de fora das células (do meio ou similar) e serem purificados sob a forma de anticorpos praticamente puros e homogêneos. Os anticorpos podem ser separados e purificados utilizando

processos convencionais de separação e purificação para a purificação de anticorpos, sem que isto constitua uma limitação. Por exemplo, os anticorpos podem ser separados e purificados por meio de uma seleção apropriada e uma combinação com cromatografia de coluna, filtração, ultrafiltração, precipitação por salificação, precipitação em solventes, extração por meio de solventes, destilação, imuno-precipitação, eletroforese em gel de SDS-poliacrilamida, isoeletrofocagem, diálise, recristalização e similares.

A cromatografia inclui, por exemplo, cromatografia por afinidade, cromatografia de permuta iónica, cromatografia hidrofóbica, filtração em gel, cromatografia de fase inversa e cromatografia de adsorção (Strategies for Protein Purification and Characterization: A Laboratory Course Manual. Ed Daniel R. Marshak et al., Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1996). Estas cromatografias podem ser realizadas utilizando a cromatografia em fase líquida, por exemplo, CLAR e CLRP (*cromatografia líquida de proteína rápida*) As colunas utilizadas para a cromatografia de afinidade incluem colunas de proteína A e colunas de proteína G. Exemplos de colunas utilizando a proteína A incluem Hyper D, POROS e Sefarose FF (GE Amersham Biosciences). A descrição também inclui anticorpos altamente purificados utilizando aqueles processos de purificação.

A atividade de ligação do recetor de IL-6 dos anticorpos obtidos pode ser medida por processos conhecidos dos especialistas na matéria. Os processos para a medição da atividade de ligação ao antigénio incluem, por exemplo, ensaio imuno-absorvente ligado a enzimas (ELISA), imuno-ensaio ligado a enzimas (IEE), radioimunoensaio (RIA) e

processos de anticorpos fluorescentes. Por exemplo, quando se utiliza um imuno-ensaio ligado a enzimas, adicionam-se, às placas revestidas com antigénio, as amostras contendo o anticorpo, tal como anticorpos purificados e sobrenadantes de culturas de células que produzem anticorpos. Adiciona-se um anticorpo secundário marcado com uma enzima tal como fosfatase alcalina e faz-se a incubação das placas. Após a lavagem, adiciona-se um substrato de enzima, tal como fosfato de p-nitrofenilo e mede-se a densidade ótica para avaliar a atividade de ligação ao antigénio.

Composições farmacêuticas

A presente invenção também tem por objeto composições farmacêuticas que contêm, como princípio ativo, um polipéptido, tal como aqui descrito. As composições farmacêuticas aqui descritas podem ser utilizadas num processo para o tratamento de doenças associada a IL-6, tal como artrite reumatóide. Assim, a presente invenção também tem por objeto agentes para serem utilizados num processo para o tratamento de doenças, tais como artrite reumatóide, que compreende, como princípio ativo, um anticorpo descrito antes. Exemplos de doenças-alvo preferidas na presente invenção incluem, mas não se limitam a artrite reumatóide, artrite idiopática juvenil, artrite idiopática juvenil sistémica, doença de Castleman, lúpus eritematoso sistémico (LES), nefrite do lúpus, doença de Crohn, linfoma, colite ulcerosa, anemia, vasculite, doença de Kawasaki, doença de Still, amiloidose, esclerose múltipla, transplante, degeneração macular relacionada com a idade, espondilite anquilosante, psoríase, artrite psoriática, doença pulmonar obstrutiva crónica (DPOC), nefropatia de IgA, osteoartrite, asma, nefropatia diabética, DECH (*doença do enxerto contra o hospedeiro*), endometriose, hepatite (DHGNA - *doença*

hepática gordurosa não alcoólica), enfarte do miocárdio, arteriosclerose, septicémia, osteoporose, diabetes, mieloma múltiplo, cancro da próstata, cancro do rim, linfoma não Hodgkin de células B, cancro do pâncreas, cancro do pulmão, cancro do esófago, cancro do cólon, caquexia do cancro, neuroinvasão do cancro, neovascularização coroidal idiopática, uveíte, tiroidite crónica, hipersensibilidade retardada, dermatite de contato, dermatite atópica, mesotelioma, polimiosite, dermatomiosite, panuveíte, uveíte anterior, uveíte intermédia, esclerite, queratite, inflamação orbital, neurite ótica, retinopatia diabética, vitreoretinopatia proliferativa, olhos secos e inflamação post-operatória.

A frase "para conter, como princípio ativo, um anticorpo anti-recetor de IL-6" significa que contém um anticorpo anti-recetor de IL-6 como pelo menos um dos princípios ativos, sem limitação particular do seu conteúdo. Além disso, as composições farmacêuticas aqui descritas podem conter outros princípios ativos, em combinação com os polipéptidos descritos antes.

As composições farmacêuticas aqui descritas podem ser utilizadas não apenas para fins terapêuticos, mas também para fins preventivos.

Os polipéptidos aqui descritos podem ser formulados de acordo com processos convencionais (ver, por exemplo, Remington's Pharmaceutical Science, última edição, Mark Publishing Company, Easton, EUA). Se necessário, podem conter veículos e/ou aditivos, aceitáveis sob o ponto de vista farmacêutico. Por exemplo, podem incluir detergentes (por exemplo, PEG e Tween), excipientes, antioxidantes (por exemplo, ácido ascórbico), agentes corantes, agentes

aromatizantes, conservantes, estabilizantes, agentes de tamponamento (por exemplo, ácido fosfórico, ácido cítrico e outros ácidos orgânicos), agentes quelantes (por exemplo, EDTA), agentes de suspensão, agente de isotonização, ligantes, desintegrantes, lubrificantes, promotores de fluidez e corretores. Contudo, os agentes aqui descritos para serem utilizados num processo para prevenir ou tratar doenças inflamatórias não estão limitados aos anteriores e podem conter, apropriadamente, outros veículos convencionais. Especificamente, os exemplos incluem ácido silícico leve anidro, lactose, celulose cristalina, manitol, amido, carmelose cálcica, carmelose sódica, hidroxipropilcelulose, hidroxipropilmetilcelulose dietil-aminoacetato de polivinilo e acetal, polivinilpirrolidona, gelatina, triglicérido de ácidos gordos de cadeia média, polioxietileno hidrogenado, óleo de rícino 60, sacarose, carboximetilcelulose, amido de milho e sais inorgânicos. Também podem conter outros polipéptidos de baixo peso molecular; proteínas tais como albumina do soro, gelatina e imunoglobulina; e aminoácidos. Quando se preparam soluções aquosas para serem utilizadas em injeções, dissolvem-se os anticorpos anti-recetor de IL-6, por exemplo, em soluções isotónicas que contêm soro fisiológico, glicose ou outros adjuvantes. Os adjuvantes incluem, por exemplo, D-sorbitol, D-manose, D-manitol e cloreto de sódio. Além disso, podem combinar-se com agentes de solubilização apropriados, por exemplo, álcool (etanol e similares), poliálcool (propileno-glicol, PEG e similares) e tensioativos não iónicos (polissorbato 80 e HCO-50).

Se necessário, os polipéptidos pode se encapsulados em microcápsulas (microcápsulas feitas de hidroxicelulose, gelatina, poli(metacrilato de metilo) e similares) ou sob a forma de um sistema coloidal de administração de fármacos

(lipossomas, microesferas de albumina, microemulsões, nanopartículas, nanocápsulas, etc) (ver, por exemplo, "Remington's Pharmaceutical Science 16ª edição", Oslo Ed 1980)). Além disso, são conhecidos os processos para a preparação de agentes, sob a forma de agentes de libertação sustentada e podem ser aplicados aos polipéptidos (Langer et al., J. Biomed. Mater. Res. (1981) 15: 167-277; Langer, Chem. Tech. (1982) 12: 98-105; patente norte-americana No. 3 773 919; pedido de patente europeia (EP) No. 58 481; Sidman et al., Biopolymers (1983) 22: 547-56; EP No. 133 988). Além disso, o volume de líquido a ser utilizado na administração subcutânea pode ser aumentado por meio da adição ou da mistura de hialurodinase a um agente (ver, por exemplo, WO 2004/078140).

As composições farmacêuticas aqui descritas podem ser administradas tanto oralmente como parentericamente, mas são administradas, preferencialmente, parentericamente. Especificamente, as composições são administradas aos doentes por injeção ou transdermicamente. As injeções incluem, por exemplo, administração sistémica e local por meio de injeções intravenosas, intramusculares ou subcutâneas ou similares. As composições podem ser injetadas localmente no sítio de tratamento ou, em particular, na periferia do sítio por injeção intramuscular. As formas farmacêuticas transdérmicas incluem, por exemplo, pomadas, géis, cremes, cataplasmas e pensos adesivos, que podem ser administrados localmente ou sistemicamente. Além disso, os processos de administração podem ser seleccionados, apropriadamente, de acordo com a idade e os sintomas do doente. A dose administrada pode ser seleccionada, por exemplo, no intervalo de 0,0001 mg a 100 mg de princípio ativo por kg de peso corporal, para cada administração. Alternativamente, quando se pretende

administrar as composições a doentes humanos, podem selecionar-se os princípios ativos, por exemplo, no intervalo de 0,001 a 1000 mg por kg de peso corporal para cada doente. Uma administração numa única dose contém, preferencialmente, por exemplo, um anticorpo aqui descrito a cerca de 0,01 a 50 mg/kg de peso corporal.

Os aminoácidos contidos nas sequências de aminoácidos da presente descrição podem ser modificados post-translacionalmente (por exemplo, a modificação de uma glutamina do terminal N num ácido piroglutâmico por piroglutamilação que é bem conhecida pelos especialistas na matéria). Naturalmente, esses aminoácidos modificados post-translacionalmente estão incluídos nas sequências de aminoácidos da presente memória descritiva.

Além disso, as cadeias de açúcar que estão ligadas aos anticorpos, de acordo com a presente invenção, podem ter qualquer estrutura. Uma cadeia de açúcar, na posição 297 (numeração da EU), pode ter a estrutura de qualquer cadeia de açúcar (preferencialmente uma cadeia de açúcar fucosilada) ou pode não estar ligada a nenhuma cadeia de açúcar (por exemplo, pode conseguir-se isto por meio da produção de anticorpos em *Escherichia coli* ou por introdução de alterações de modo que nenhuma cadeia de açúcar se ligue na posição 297, numeração da EU).

Exemplos

A seguir, a presente invenção vai ser descrita especificamente com referência aos exemplos.

[Exemplo 1] Identificação de sítios de mutação em regiões variáveis para aumentar a afinidade de TOCILIZUMABE para o recetor de IL-6

Construiu-se uma biblioteca de sequências de RDC nas quais tinham sido introduzidas modificações e fez-se a sua análise para aumentar a eficácia de TOCILIZUMABE (WT-IgG1 de cadeia P/SEQ ID NO: 53; WT-kapa da cadeia L/SEQ ID NO: 54) para o recetor de IL-6. O rastreio de uma biblioteca de mutações de RDC revelou mutações que melhoram a afinidade para o recetor de IL-6. As mutações estão ilustradas na fig.1. Uma combinação destas mutações originou TOCILIZUMABE de elevada afinidade tal como RDC-23 (RDC23H-IgG1 de cadeia P/SEQ ID NO: 55; RDC-23L-kapa de cadeia L/SEQ ID NO: 56). Comparou-se a afinidade para o recetor de IL-6 solúvel e a atividade biológica determinada utilizando BaF/gp130 entre RDC-23 e TOCILIZUMABE (ver os exemplos de referência para o processo).

No quadro 1 ilustra-se o resultado da medição da afinidade. O resultado da determinação da atividade biológica utilizando BaF/gp130 (a concentração final de IL-6 foi de 30 ng/ml) está ilustrado na fig. 2. Os resultados mostraram que a a afinidade de RDC-23 era cerca 60 vezes superior e a atividade expressa como concentração, para uma inibição de 100 % de BaF/gp130 foi cerca de 100 vezes superior quando comparada com TOCILIZUMABE.

Quadro 1

	k_a (1/Ms)	k_d (1/s)	KD (M)
TOCILIZUMABE	4,9E+05	2,0E-03	4,0E-09
RDC-23	6,4E+05	4,3E-05	6,7E-11

[Exemplo 2] Identificação de mutações para melhorar a farmacocinética de TOCILIZUMABE por via da redução do seu ponto isoelétrico

Para melhorar a farmacocinética de TOCILIZUMABE, realizou-se uma investigação para identificar sítios de mutação que diminuiriam o ponto isoelétrico das regiões variáveis, sem uma redução significativa da ligação ao recetor de IL-6. O rastreio de sítios de mutação nas regiões variáveis, que se previram com base num modelo com uma estrutura tridimensional de TOCILIZUMABE, revelou os sítios de mutação que diminuiriam o ponto isoelétrico das regiões variáveis sem reduzir significativamente a sua ligação ao recetor de IL-6. Os resultados estão ilustrados na fig.3. Uma combinação destas mutações originará TOCILIZUMABE com um ponto isoelétrico reduzido, incluindo, por exemplo, H53/L28 (P53-IgG1 de cadeia P/SEQ ID NO: 57; L28-kapa da cadeia L/SEQ ID NO: 58). Comparou-se a afinidade para o recetor de IL-6 solúvel, o ponto isoelétrico, a farmacocinética em murganhos e a atividade biológica determinada utilizando BaF/gp130, entre H53-23 e TOCILIZUMABE (ver os exemplos de referência para o processo).

No quadro 2 ilustra-se o resultado da medição da afinidade. O resultado da medição para a atividade biológica obtida utilizando BaF/gp130 (a concentração final de IL-6 foi de 30 ng/ml) está ilustrado na fig. 4. Os resultados mostraram que a afinidade de H53/L283 era cerca seis vezes superior e a atividade expressa como concentração, para a inibição de 100 % de BaF/gp130 foi cerca de várias vezes superior quando comparada com a de TOCILIZUMABE.

Quadro 2

k_a (1/MS)	k_d (1/s)	KD (M)
TOCILIZUMABE	4,9E+05	2,0E-03
H53/L283	4,0E+06	4,0E-09

O resultado da determinação do ponto isoelétrico por eletroforese, conhecido dos especialistas na matéria, mostrou que os pontos isoelétricos de TOCILIZUMABE e H53/L28 foram de cerca de 9,3 e 6,5 a 6,7, respectivamente. Assim, o ponto isoelétrico de H53/L28 foi reduzido de cerca de 2,7 quando comparado com TOCILIZUMABE. Além disso, calculou-se o ponto isoelétrico teórico das regiões variáveis de VP/VL utilizando o GENETYX (GENETYX CORPORATION). O resultado mostrou que os pontos isoelétricos teóricos de TOCILIZUMABE e H53/L28 eram de 9,20 e 4,52, respectivamente. Assim, o ponto isoelétrico de H53/L28 foi reduzido de cerca de 4,7 quando comparado com TOCILIZUMABE.

Para avaliar a farmacocinética do anticorpo alterado 53/L28 que tinha um ponto isoelétrico reduzido, comparou-se a farmacocinética de TOCILIZUMABE com a de H53/L28 em murganhos normais. Uma única dose de TOCILIZUMABE ou de H53/L28 foi administrada intravenosamente (IV) ou subcutaneamente (SC), a 1 mg/kg, a murganhos (C57BL/6J; Charles River Japan, Inc.) para avaliar a concentração no plasma ao longo do tempo. A concentração no plasma ao longo do tempo para TOCILIZUMABE e H53/L28, após a administração intravenosa ou a administração subcutânea, está ilustrada nas figs. 5 e 6, respectivamente. Os parâmetros farmacocinéticos (clearance (CL) e semi-período de vida ($T_{1/2}$)) obtidos utilizando WinNonlin (Pharsight) estão ilustrados no quadro 3. O semi-período de vida no plasma ($T_{1/2}$) de H53/L28, após a administração intravenosa, foi prolongado cerca de 1,3 vezes em relação ao TOCILIZUMABE, embora a clearance se tenha reduzido cerca de 1,7 vezes. $T_{1/2}$ de H53/L28, após a administração subcutânea, aumentou cerca de

duas vezes em relação ao TOCILIZUMABE, embora a clearance se tenha reduzido cerca de 2,1 vezes. Assim, verificou-se que a farmacocinética podia ser significativamente melhorada por meio da redução do ponto isoelétrico de TOCILIZUMABE, através da substituição dos aminoácidos.

Quadro 3

	IV		SC	
	CL mL/h/kg	T1/2 dia	CL/F mL/h/kg	T1/2 dia
TOCILIZUMABE	0,177	18,5	0,18	14,7
H53/L28	0,102	23,5	0,086	29,7

[Exemplo 3] Identificação dos sítios de mutação que reduzem a imunogenicidade de TOCILIZUMABE

Identificação das mutações que reduzem o risco de imunogenicidade dos epítomos de células T presentes nas regiões variáveis

Os epítomos de células T presentes nas sequências de regiões variáveis de TOCILIZUMABE foram analisadas utilizando TEPITOPE (Methods. Dez 2004; 34(4): 468-75). Como resultado, previu-se que a RDC2 de cadeia L tinha muitos epítomos de células T que se ligariam a HLA (isto é, tinha uma sequência com um elevado risco de imunogenicidade). Assim, realizou-se a análise de TEPITOPE para examinar as substituições de aminoácidos que poderiam reduzir o risco de imunogenicidade da RDC2 de cadeia L, sem diminuir a estabilidade, a atividade de ligação ou a atividade de neutralização.

Tal como se descreve a seguir, o resultado do rastreio demonstrou que o risco de imunogenicidade pode ser reduzido sem diminuir a estabilidade, a atividade de ligação ou a atividade de neutralização, por substituição da treonina em

L51 (numeração de Kabatg; Kabat EA et al., (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, NIH)) da RDC2 de cadeia L (SEQ ID NO: 59) de TOCILIZUMABE por glicina e da arginina em L53 por ácido glutâmico (SEQ ID NO: 60).

RDC2 da cadeia L de TOCILIZUMABE (SEQ ID NO: 59)

RDC2 da cadeia L de TOCILIZUMABE com os epítomos das células T eliminados (SEQ ID NO: 60)

[Exemplo 4] Redução do risco de imunogenicidade por humanização completa das sequências da estrutura da região variável de TOCILIZUMABE

No processo de humanização de TOCILIZUMABE, algumas sequências de murganhão permaneceram na sequência estrutural para manter a atividade de ligação (Cancer Res. 15 Fev 1993; 53(4): 851-6). Estas sequências são P27, P28, P29 e P30 na RE1 de cadeia P e P71 na RE3 de cadeia P (Kabat's numbering; Kabat EA et al., (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, NIH)) da sequência da região variável de TOCILIZUMABE. As sequências de murganhão que permaneceram são uma causa potencial do aumento do risco de imunogenicidade. Assim, avaliou-se se a sequência da estrutura podia ser completamente humanizada para reduzir mais o risco de imunogenicidade de TOCILIZUMABE.

O resultado mostrou que toda a estrutura de TOCILIZUMABE podia ser completamente humanizada sem diminuição da estabilidade, atividade de ligação ou atividade de neutralização, por substituição de RE1 de cadeia P (SEQ ID NO: 61) de TOCILIZUMABE pela RE1-A de cadeia P humanizada (SEQ ID NO: 62), que se mostra a seguir e a substituição de RE3 de cadeia P (SEQ ID NO: 63) pela RE3 de cadeia P humanizada (SEQ ID NO: 64) ilustrada a

seguir.

RE1 de cadeia P de TOCILIZUMABE (SEQ ID NO: 61)

RE1-A de cadeia P de TOCILIZUMABE (SEQ ID NO: 62) (derivada da linha germinal hVP_4 de IMGT)

RE3 de cadeia P de TOCILIZUMABE (SEQ ID NO: 63)

RE3 de cadeia P humanizada (SEQ ID NO: 64) (derivada de Mol. Immunol. 2007, 44(4): 412-422).

[Exemplo 5] Identificação de sítios de mutação para melhorar a farmacocinética com base na ligação de TOCILIZUMABE ao recetor de IL-6, dependente do pH.

Um dos processos para melhorar a farmacocinética de TOCILIZUMABE consiste em melhorar a molécula de tal modo que uma única molécula de TOCILIZUMABE iria ligar-se repetidamente e neutralizar várias moléculas do recetor de IL-6. Assume-se que após a ligação ao recetor de IL-6 do tipo de membrana, o TOCILIZUMABE é absorvido nos endossomas intracelulares por via da internalização, enquanto se liga ao recetor de IL-6 do tipo de membrana, depois é transferido para os lisossomas e depois ligam-se ao recetor de IL-6 do tipo de membrana, sendo depois degradado pelos lisossomas. Especificamente, uma molécula de TOCILIZUMABE normalmente liga-se a uma ou duas moléculas do recetor de IL-6 do tipo de membrana (de uma forma monovalente ou bivalente) e degrada-se em lisossomas, depois da internalização. Por isso, uma molécula de TOCILIZUMABE pode ligar-se e neutralizar apenas uma ou duas moléculas do recetor de IL-6 do tipo de membrana.

Assim, se for possível produzir TOCILIZUMABE que se ligue de uma forma dependente do pH, em que se mantém a ligação de TOCILIZUMABE, em condições neutras, mas de forma significativamente reduzida em condições ácidas, o

TOCILIZUMABE que se liga de uma forma dependente do pH pode dissociar-se do recetor de IL-6 do tipo de membrana (antigénio) nos endossomas e voltar ao plasma por meio da ligação da FcRn presente nos endossomas, tal como ilustrado na fig. 7. Uma vez retornado ao plasma, o TOCILIZUMABE que se liga de uma forma dependente do pH pode ligar-se novamente ao recetor de IL-6 do tipo de membrana. Por meio da repetição desta ligação no plasma e a dissociação nos endossomas, pensa-se que uma molécula de TOCILIZUMABE pode ligar-se/neutralizar, repetidamente, várias moléculas do recetor de IL-6. Assim, assume-se que o TOCILIZUMABE que se liga de uma forma dependente do pH tenha melhorado a farmacocinética, em comparação com o TOCILIZUMABE.

Para o TOCILIZUMABE se dissociar do recetor de IL-6, em condições ácidas, nos endossomas, a ligação deve ficar significativamente enfraquecida em condições ácidas, quando comparada com as condições neutras. Na superfície das células, é necessária, para a neutralização, uma forte ligação do recetor de IL-6; por isso, a pH 7,4, que é o pH da superfície das células, o anticorpo deve ligar-se ao recetor de IL-6, tão fortemente ou mais fortemente do que TOCILIZUMABE. Já foi referido que o pH endossómico é geralmente de 5,5 a 6,0 (Nat Rev Mol Cell Biol. Fev 2004; 5(2): 121-32). Assim, se o TOCILIZUMABE, que se liga, de uma forma dependente do pH, estiver modificado para se ligar fracamente ao recetor de IL-6, a pH 5,5 a 6,0, pode-se prever dissociar do recetor de IL-6, em condições ácidas, nos endossomas. Especificamente, se o TOCILIZUMABE, que se liga de uma forma dependente do pH, estiver melhorado, para se ligar fortemente ao recetor de IL-6, a pH 7,4, que é o pH da superfície das células e se ligar fracamente ao recetor de IL-6, a pH 5,5 a 6,0, que é o pH endossómico, uma molécula de TOCILIZUMABE pode ligar-

se/neutralizar várias moléculas do recetor de IL-6 e assim melhorar a farmacocinética.

Um processo possível para conferir a dependência do pH na ligação de TOCILIZUMABE ao recetor de IL-6 consiste em introduzir resíduos de histidina na região variável de TOCILIZUMABE, dado que o pKa de um resíduo de histidina é de cerca de 6,0 a 6,5 e o seu estado de dissociação do protão altera-se entre condições neutras (pH 7,4) e condições ácidas (pH 5,5 a 6,0). Assim, realizou-se um rastreio para identificar sítios para a introdução de histidina nas regiões variáveis, com base num modelo de estrutura tridimensional de TOCILIZUMABE. Além disso, as sequências seleccionadas da região variável de TOCILIZUMABE foram substituídas aleatoriamente com histidina para conceber uma biblioteca para o rastreio. Realizou-se o rastreio utilizando a ligação ao recetor de IL-6, a pH 7,4 e a dissociação do recetor de IL-6 ou a redução de afinidade a pH 5,5 a 5,8, como um índice.

Como resultado, descobriram-se sítios de mutação que conferem a ligação de TOCILIZUMABE ao recetor de IL-6, com dependência do pH (a propriedade de se ligar a pH 7,4 e dissociar a pH 5,8). Os resultados estão ilustrados na fig.8. Na fig. 8, a substituição de tirosina, em P27, por histidina, é uma mutação na RE1 de cadeia P e não na RDC. Contudo, tal como descrito em Eur. J. Immunol. (1992) 22: 1719-1728, uma sequência com histidina, em P27, é uma sequência humana (SEQ ID NO: 65). Assim, o anticorpo pode ser completamente humanizado por meio da utilização das estruturas que se seguem, em combinação com o exemplo 4. RE1-B de cadeia P humanizada (SEQ ID NO: 65)

Uma combinação de mutações incluindo, por exemplo, P3pI/L73 (cadeia P, P3pI-IgG1/SEQ ID NO: 66; L73-kapa de cadeia L/SEQ ID NO: 67) pode originar TOCILIZUMABE, com propriedades de ligação dependentes do pH. Compararam-se P3pI/L73 e TOCILIZUMABE quanto à sua afinidade em relação ao recetor de IL-6 solúvel, a pH 7,4, a taxa de dissociação do recetor de IL-6 do tipo de membrana, a pH 7,4 e a pH 5,8, a atividade biológica utilizando BaF/gp130 e a farmacocinética em macacos cinomólogos e murganhos transgênicos do recetor humano de IL-6 (ver os exemplos de referência para o processo).

O resultado do ensaio de afinidade para o recetor de IL-6 solúvel, a pH 7,4 está ilustrado no quadro 4. O resultado do ensaio para a atividade biológica, obtido utilizando BaF/gp130 (a concentração final de IL-6 foi de 30 ng/ml) está ilustrado na fig. 9. Estes resultados mostraram que H3pI/L73 é comparável com TOCILIZUMABE, em termos de afinidade com o recetor de IL-6 solúvel, a pH 7,4 e a atividade em BaF/gp130.

Quadro 4

	k_a (1/Ms)	k_d (1/s)	KD (M)
TOCILIZUMABE	5,1E+05	1,0E-03	2,1E-09
H3pI/L73	5,4E+05	7,4E-04	1,4E-09

O resultado da medição da taxa de dissociação de TOCILIZUMABE ou P3pI/L73 do recetor de IL-6 do tipo de membrana, a pH 7,4 e a pH 5,8, está ilustrado no quadro 5. Quando se compara com TOCILIZUMABE, a taxa de dissociação de H3pI/L73, a pH 5,8, foi mais rápida e a dependência do pH, da taxa de dissociação do recetor de IL-6 do tipo de membrana, aumentou cerca de 2,6 vezes.

Quadro 5

pH 7,4	k_d (1/s)	pH 5,8	k_d (1/s)	k_d (pH5,8) / k_d (pH7,4)	DEPENDÊNCIA DO pH
--------	-------------	--------	-------------	-------------------------------	-------------------

TOCILIZUMABE	2,5E-04	2,5E-04	1,00
H3pI/L73	2,6E-04	6,7E-04	2,59

Administrou-se, intravenosamente, uma única dose de TOCILIZUMABE ou H3pI/L73 a 1 mg/kg, a macacos cinomólogos para avaliar a concentração no plasma ao longo do tempo. A concentração no plasma ao longo do tempo de TOCILIZUMABE ou de H3pI/L73, após a administração intravenosa, está ilustrada na fig. 10. O resultado mostrou que a farmacocinética de H3pI/L73, em macacos cinomólogos, aumentou significativamente em comparação com a do TOCILIZUMABE.

Administrou-se, intravenosamente, uma única dose de TOCILIZUMABE ou de H3pI/L73, a 25 mg/kg, a murganhos transgênicos, com recetor de IL-6 humano (hIL-6R tg mice; Proc Natl Acad Sci U S A. 23 Maio 1995; 92(11): 4862-6) para avaliar a concentração no plasma ao longo do tempo. A concentração no plasma ao longo do tempo de TOCILIZUMABE ou de H3pI/L73, após a administração intravenosa, está ilustrada na fig. 11. O resultado mostrou que a farmacocinética de H3pI/L73, em murganhos transgênicos, com recetor de IL-6 humano, aumentou significativamente em comparação com o TOCILIZUMABE.

H3pI/L73, que é um TOCILIZUMABE com propriedades de ligação dependentes do pH, mostrou uma farmacocinética significativamente melhorada em macacos cinomólogos e murganhos transgênicos, com recetor de IL-6 humano, em comparação com o TOCILIZUMABE. Isto sugere que é possível ligar e neutralizar várias moléculas do recetor de IL-6, com uma única molécula, conferindo a propriedade de ligação de um antigénio, a pH 7,4 e dissociar do antigénio a pH 5,8. Também se considerou que a farmacocinética ainda podia melhorar mais conferindo a ligação do recetor de IL-6

com a dependência mais pronunciada do pH do que a de H3pI/L73.

[Exemplo 6] Otimização da região constante de TOCILIZUMABE

Redução da heterogeneidade do terminal C de cadeia P de TOCILIZUMABE

No que respeita à heterogeneidade das sequências de terminal C de cadeia P do anticorpo, já foi relatada a eliminação do resíduo do aminoácido lisina, no terminal C e a amidação do grupo carboxilo do terminal C, devido à eliminação dos dois aminoácidos do terminal C, glicina e lisina (Anal Biochem. 1 Jan 2007; 360(1): 75-83). No TOCILIZUMABE, o componente principal é também uma sequência na qual o aminoácido lisina do terminal C, na sequência de ácidos nucleicos, está eliminado por meio de uma modificação post-translacional; contudo, os sub-componentes em que a lisina permanece e os sub-componentes em que o grupo carboxilo do terminal C está amidado, devido à eliminação tanto da lisina como da glicina, existem como heterogeneidade. Não é fácil e será mais caro fabricá-los em larga escala, como produtos farmacêuticos, embora se mantenham, entre produções, as substâncias objetivo/substâncias relacionadas, que estão relacionadas com a heterogeneidade. Se possível, é desejável que sejam substâncias únicas e que tenham uma heterogeneidade reduzida quando se desenvolvem anticorpos como produtos farmacêuticos. Assim, é preferível que a heterogeneidade do terminal C de cadeia P esteja ausente quando se desenvolvem anticorpos como produtos farmacêuticos.

O aminoácido do terminal C foi alterado para reduzir a heterogeneidade do aminoácido do terminal C. O resultado

mostrou que a heterogeneidade derivada do terminal C pode ser prevenida por meio de uma pré-eliminação, da sequência de nucleótidos, dos resíduos de lisina e de glicina, no terminal C da região constante de cadeia P de TOCILIZUMABE. O TOCILIZUMABE, o TOCILIZUMABE a que falta o resíduo de lisina do terminal C (TOCILIZUMABEΔK: WT-IgG1ΔK de cadeia P/SEQ ID NO: 68; WT-kapa de cadeia L/SEQ ID NO: 54) e TOCILIZUMABE a que faltam os resíduos de lisina e de glicina do terminal C (TOCILIZUMABEΔGK: WT-IgG1ΔK de cadeia P/SEQ ID NO: 69; WT-kapa da cadeia L/SEQ ID NO: 54) foram avaliados, quanto à heterogeneidade, por meio de cromatografia de permuta catiónica. Utilizou-se a coluna ProPac WCX-10, 4x250 mm (Dionex); e a fase A móvel foi de 25 mmole/L de MES/NaOH, 250 mmole/L de NaCl (pH 6,1) e a fase móvel B foi de 25 mmole/L de MES/NaOH, 250 mmole/L de NaCl (pH 6,1). Utilizou-se uma velocidade de fluxo e o gradiente apropriados. O resultado obtido na avaliação feita por cromatografia de permuta catiónica está ilustrado na fig. 12. O resultado mostrou que a heterogeneidade dos aminoácidos do terminal C pode ser reduzida por pré-eliminação da sequência de nucleótidos tanto dos resíduo de lisina como de glicina, no terminal C da região constante de cadeia P, mas não pré-eliminando apenas o resíduo de lisina no terminal C da região constante de cadeia P. Todas as sequências do terminal C da região constante dos anticorpos humanos IgG1, IgG2 e IgG4 contêm lisina e glicina nas posições 447 e 446, respectivamente, de acordo com a numeração da EU (ver, Sequences of proteins of immunological interest, NIH Publication No.91-3242). Por isso, espera-se que o processo de redução da heterogeneidade dos aminoácidos do terminal C, encontrado no estudo, seja aplicável às regiões constantes de IgG2 e IgG4 e às suas variantes.

Redução da heterogeneidade derivada da ligação de disulfureto em TOCILIZUMABE do isotipo IgG2

O isotipo de TOCILIZUMABE é a IgG1. Dado que o TOCILIZUMABE é um anticorpo de neutralização, a ligação ao recetor de Fc γ pode ser desfavorável tendo em vista a imunogenicidade e os efeitos adversos. Um processo possível para a diminuição da ligação do recetor de Fc γ consiste em converter o isotipo do anticorpo IgG de IgG1 a IgG2 ou IgG4 (Ann Hematol. Jun 1998; 76 (6): 231-48). Do ponto de vista da farmacocinética e da ligação do recetor I de Fc γ , considera-se que IgG2 seja mais desejável do que IgG4 (Nat Biotechnol. Dez 2007; 25(12): 1369-72). Entretanto, as propriedades físico-químicas das proteínas, em particular, a homogeneidade e a estabilidade, são muito importantes quando se desenvolvem anticorpos como produtos farmacêuticos. O isotipo IgG2 tem sido referido como tendo uma heterogeneidade muito elevada, devido às ligações de disulfureto na região de charneira (J Biol Chem. 6 Jun 2008; 283(23): 16206-15). Não é fácil e será mais caro fabricá-los em larga escala, como produtos farmacêuticos, embora se mantenham as substâncias objetivo/substâncias relacionadas, que estão relacionadas com a heterogeneidade derivada de ligações de di-sulfureto entre as produções. Assim, são desejáveis substâncias simples, tantas quanto possível. Assim, quando se desenvolvem anticorpos do isotipo IgG2, sob a forma de produtos farmacêuticos, é preferível reduzir a heterogeneidade derivada de ligações de di-sulfureto, sem abaixamento da estabilidade.

Com a finalidade de redução da heterogeneidade do isotipo IgG2, avaliaram-se várias variantes. Como resultado, verificou-se que a heterogeneidade poderia ser reduzida sem o decréscimo da estabilidade, utilizando a

região constante de WT-SKSC (SEQ ID NO: 70), em que as sequências da região constante de IgG2, o resíduo de cisteína na posição 131 e o resíduo de arginina na posição 133 (numeração da EU), no domínio CP1 de cadeia P estavam substituídos por serina e lisina, respetivamente e o resíduo de cisteína na posição 219 (numeração da EU) na charneira superior da cadeia P estava substituída por serina. TOCILIZUMABE-IgG1 (WT-IgG1 de cadeia P/SEQ ID NO: 53; WT-kapa da cadeia L/SEQ ID NO: 54) TOCILIZUMABE-IgG2 (WT-IgG2 de cadeia P (SEQ ID NO: 71; WT-kapa da cadeia L/SEQ ID NO: 54) e TOCILIZUMABE-SKSC (WT-IgG2 de cadeia P (SEQ ID NO: 70; WT-kapa da cadeia L/SEQ ID NO: 54) foram preparados e avaliados quanto à sua heterogeneidade e estabilidade. Avaliou-se a heterogeneidade por cromatografia de permuta catiónica. Utilizou-se a coluna ProPac WCX-10 (Dionex); e a fase A móvel foi de acetato de sódio 20 mM (pH 5,0) e a fase móvel B foi de acetato de sódio 20 mM, NaCl 1 M (pH 5,0). Utilizou-se a velocidade de fluxo e o gradiente apropriados. O resultado obtido na avaliação, feita por cromatografia de permuta catiónica, está ilustrado na fig. 13. Avaliou-se a estabilidade com base na temperatura intermédia na desnaturação térmica (valor de Tm), determinada por calorimetria diferencial de varrimento (CDV) (VP-DSC; Microcal). O resultado da medição por CDV, em acetato de sódio 20 mM, NaCl 150 mM, a pH 6,0 e o valor de Tm do domínio Fab, estão ilustrados na fig. 14.

O resultado mostrou que a heterogeneidade estava marcadamente aumentada em TOCILIZUMABE-IgG2, em comparação com TOCILIZUMABE-IgG1; contudo, a heterogeneidade podia ser significativamente reduzida por conversão para TOCILIZUMABE-SKSC. Além disso, quando se compara com TOCILIZUMABE-IgG1, a CDV de TOCILIZUMABE-IgG2 originou um componente do pico com um ressalto (Fab*) com baixa

estabilidade, isto é, baixo T_m , nos picos de desnaturação térmica do domínio de Fab, que se assume que seja devido a um componente heterogéneo. Contudo, quando se converte em TOCILIZUMABE-SKSC, o pico com ressalto (baixo T_m), que se pensa que seja devido a um componente heterogéneo, desaparece e o valor de T_m era de cerca de 94 °C, que era equivalente ao do domínio Fab de TOCILIZUMABE-IgG1 e de TOCILIZUMABE-IgG2. Assim, o TOCILIZUMABE-SKSC revelou que tem uma elevada estabilidade.

Identificação dos sítios de mutação que melhoram a farmacocinética na região constante de TOCILIZUMABE

Tal como se descreveu antes, partindo de IgG1, que é o isotipo de TOCILIZUMABE, pode conseguir-se a redução da heterogeneidade do terminal C e a redução da heterogeneidade dos anticorpos com as regiões constante do isotipo IgG2, ao mesmo tempo que se reduz a ligação ao recetor de Fc γ e se mantém a elevada estabilidade. Além disso, prefere-se que a região constante também tenha uma farmacocinética superior a IgG1, que é o isotipo de TOCILIZUMABE.

Para se encontrar regiões constantes que tenham um semi-período de vida no plasma superior ao dos anticorpos com regiões constantes de isotipo IgG1, fez-se um rastreio para identificar os sítios de mutação para melhorar a farmacocinética de TOCILIZUMABE-SKSC que tem uma elevada estabilidade e uma heterogeneidade reduzida relativamente aos anticorpos com regiões constantes de isotipo IgG2, tal como mencionado antes. Como resultado, descobriu-se que WT-M58 (SEQ ID NO: 72 (sequência de aminoácidos)) por si só, quando comparado com WT-SKSC, tem o ácido glutâmico na posição 137 (numeração da EU) substituído por glicina, a

serina na posição 138 substituída por glicina, a histidina na posição 268 substituída por glutamina, a arginina na posição 355 substituída por glutamina, a glutamina na posição 419 substituída por ácido glutâmico e em que a glicina na posição 446 e a lisina na posição 447 estão eliminadas para reduzir a heterogeneidade do terminal C de cadeia P. Além disso, WT-M44 (SEQ ID NO: 73 (sequência de aminoácidos)) foi preparada para ter a substituição de asparagina, na posição 434 por alanina, relativamente a IgG1. Além disso, WT-M83 (SEQ ID NO: 74 (sequência de aminoácidos)) foi produzida por eliminação de glicina na posição 446 e a lisina na posição 447 a partir de M44 para reduzir a heterogeneidade do terminal C de cadeia P. Além disso, WT-M83 (SEQ ID NO: 75 (sequência de aminoácidos)) foi produzida por substituição de asparagina, na posição 434 por alanina em WT-M58.

O TOCILIZUMABE-M44 (WT-M44 de cadeia P (SEQ ID NO: 73; WT-kapa da cadeia L/SEQ ID NO: 54) TOCILIZUMABE-M58 (WT-M58 de cadeia P (SEQ ID NO: 72; WT-kapa da cadeia L/SEQ ID NO: 54) e TOCILIZUMABE-M73 (WT-M73 de cadeia P (SEQ ID NO: 75; WT-kapa da cadeia L/SEQ ID NO: 54) foram preparados e avaliados quanto à sua afinidade para FcRn humana e a farmacocinética utilizando FcRn humana de murganhos transgênicos (ver os exemplos de referência para o processo).

Avaliou-se a ligação de TOCILIZUMABE-IgG1, TOCILIZUMABE-M44, TOCILIZUMABE-M58 e TOCILIZUMABE-M73 à FcRn humana, utilizando Biacore. Como se mostra no quadro 6, a ligação de TOCILIZUMABE-M44, TOCILIZUMABE-M58 e TOCILIZUMABE-M73 era cerca de 2,7 vezes, 1,4 vezes e 3,8 vezes superior ao de TOCILIZUMABE-IgG1, respectivamente.

Quadro 6

	KD (μ M)
TOCILIZUMABE-IgG1	1,62
TOCILIZUMABE-M44	0,59
TOCILIZUMABE-M58	1,17
TOCILIZUMABE-M73	0,42

TOCILIZUMABE-IgG1, TOCILIZUMABE-M44, TOCILIZUMABE-M58 e TOCILIZUMABE-M73 foram avaliados quanto à sua farmacocinética em FcRn humana de murganhos transgênicos. Os resultados estão ilustrados na fig.15. Quando comparado com TOCILIZUMABE-IgG1, verificou-se que todos os TOCILIZUMABE-M44, TOCILIZUMABE-M58 e TOCILIZUMABE-M73 exibiam uma farmacocinética melhor, como se mostra na fig. 15. O efeito de melhoria da farmacocinética está correlacionado com a capacidade para se ligar a FcRn humana. Em particular, a concentração de of TOCILIZUMABE-M73 no plasma, após 28 dias, aumentou cerca de 16 vezes, em comparação com TOCILIZUMABE-IgG1. Assim, os anticorpos que têm a região constante de M73 foram também assumidos como tendo uma farmacocinética significativamente melhorada em seres humanos, em comparação com anticorpos tendo a região constante de IgG1.

[Exemplo 7] Preparação de anticorpos do recetor de IL-6 completamente humanizados com a FC/PD melhorada

Prepararam-se variantes de TOCILIZUMABE por combinação de várias mutações nas regiões variável e constante de TOCILIZUMABE, encontradas nos exemplos anteriores. Os anticorpos do recetor de IL-6, completamente humanizados, descobriram-se a partir de vários rastreios foram: Fv3-M73 (VP4-M73 de cadeia P (SEQ ID NO: 25; VL1-kapa da cadeia L/SEQ ID NO: 28), Fv4-M73 (VH3-M73 de cadeia P/SEQ ID NO: 26; VL3-kapa da cadeia L/SEQ ID NO: 29) e Fv5-M83 (VP5-M83

de cadeia P/SEQ ID NO: 27; VL5-kapa da cadeia L/SEQ ID NO: 30).

As afinidades dos Fv3-M73, Fv4-M73 e Fv5-M83 preparados contra o recetor de IL-6 foram comparadas com a de TOCILIZUMABE (ver o exemplo de referência para o processo). As afinidades destes anticorpos para o recetor de IL-6 solúvel, determinadas a pH 7,4, estão ilustradas no quadro 7. Além disso, suas atividades de neutralização de BaF/gp130 foram comparadas com as de TOCILIZUMABE e do controlo (o anticorpo anti-recetor de IL-6 de alta afinidade conhecido, descrito no exemplo de referência e VQ8F11-21 hIgG1 descrito na patente norte-americana 2007/0280945) (ver os exemplos de referência par o processo). Os resultados obtidos por determinação das atividades biológicas destes anticorpos, utilizando BaF/gp130 estão ilustrados na fig. 16 (TOCILIZUMABE, o controlo e Fv5-M83 com uma concentração final de IL-6 de 300 ng/ml) e na fig. 17 (TOCILIZUMABE, Fv3-M73 e Fv4-M73 com uma concentração final de IL-6 de 30 ng/ml). Como se mostra no quadro 7, Fv3-M73 e Fv4-M73 têm uma afinidade cerca de duas a três vezes superior à de TOCILIZUMABE, enquanto Fv5-M83 exhibe uma afinidade cerca de 100 vezes superior à afinidade de TOCILIZUMABE (dado que foi difícil medir a afinidade de Fv5-M83, em vez disso determinou-se a afinidade utilizando Fv5-IgG1 (VP5-IgG1 de cadeia P/SEQ ID NO: 76; VL5-kapa da cadeia L/SEQ ID NO: 30), que tem uma região constante do tipo IgG1; pensa-se que a região constante não tem geralmente efeito na afinidade). Como se mostra na fig. 17, Fv3-M73 e Fv4-M73 exibem atividades ligeiramente mais fortes do que TOCILIZUMABE. Como se mostra na fig. 16, Fv5-M83 tem uma atividade muito forte, que é mais do que 100 vezes maior do que a de TOCILIZUMABE, em termos de concentração inibidora de 50 %. Fv5-M83 também

exibe uma atividade de neutralização cerca de 10 vezes superior, em termos de concentração inibidora de 50 %, à do controlo (o conhecido anticorpo anti-recetor de IL-6 de elevada afinidade).

Quadro 7

	k_a (1/MS)	k_d (1/s)	KD (M)
TOCILIZUMABE	$4,0E+05$	$1,1E-03$	$2,7E-09$
Fv3-M73	$8,5E+05$	$8,7E-04$	$1,0E-09$
Fv4-M73	$7,5E+05$	$1,0E-03$	$1,4E-09$
Fv5-M83	$1,1E+06$	$2,8E-05$	$2,5E-11$

Determinaram-se as taxas de dissociação de TOCILIZUMABE, Fv3-M73 e Fv4-M73 do recetor de IL-6 do tipo de membrana, a pH 7,4 e 5,8. Tal como demonstrado pelo resultado ilustrado no quadro 8 (ver exemplo de referência para o processo), a dependência do pH, da taxa de dissociação de Fv3-M73 e Fv4-M73, a partir do recetor de IL-6 do tipo de membrana, foi de cerca de 11 vezes e foi 10 vezes melhorada, respetivamente, em comparação com o TOCILIZUMABE. A melhoria considerável da taxa de dissociação dependente do pH, relativamente ao H3pI/L73, descrito no exemplo 5, sugeriu que, quando comparado com H3pI/L73, a farmacocinética de Fv3-M73 e de Fv4-M73 seria significativamente melhorada.

Quadro 8

	pH 7,4 k_d (1/s)	pH 5,8 k_d (1/s)	$k_d(pH5,8)/k_d(pH7,4)$	DEPENDÊNCIA do pH
TOCILIZUMABE	$2,5E-04$	$2,5E-04$		1,00
Fv3-M73	$4,9E-04$	$5,3E-03$		10,88
Fv4-M73	$5,1E-04$	$5,1E-03$		10,06

Determinaram-se os pontos isoeletricos de TOCILIZUMABE, do controlo, de Fv3-M73, Fv4-M73 e Fv5-M83, por eletroforese de focagem isoeletrica, utilizando um processo conhecido dos especialistas na matéria. O

resultado mostrou que o ponto isoelétrico era de cerca de 9,3 para TOCILIZUMABE; cerca de 8,4 a 8,5 para o controlo; cerca de 5,7 a 5,8 para Fv3-M73; cerca de 5,6 a 5,7 para Fv4-M73; e 5,4 a 5,5 para Fv5-M83. Assim, cada anticorpo tinha um ponto isoelétrico significativamente baixo quando comparado com TOCILIZUMABE e com o controlo. Além disso, calculou-se o ponto isoelétrico teórico das regiões variáveis de VP/VL por meio do GENETYX (GENETYX CORPORATION). O resultado mostrou que o ponto isoelétrico teórico foi de 9,20 para TOCILIZUMABE; 7,79 para o controlo; 5,49 para Fv3-M73; 5,01 para Fv4-M73; e 4,27 para Fv5-M83. Assim, cada anticorpo tinha um ponto isoelétrico significativamente baixo quando comparado com TOCILIZUMABE e com o controlo. Tal como se mostrou no exemplo 2 que a farmacocinética melhorou por meio da redução do ponto isoelétrico, pensa-se que a farmacocinética de Fv3-M73, Fv4-M73 e Fv5-M83 é melhor, quando comparada com a de TOCILIZUMABE e do controlo.

Os epítomos das células T, na sequência da região variável de TOCILIZUMABE, Fv3-M73, Fv4-M73 ou Fv5-M83 foram analisados utilizando TEPITOPE (Methods. Dez 2004; 34(4): 468-75). Como resultado, previu-se que o TOCILIZUMABE tinha epítomos de células T, dos quais muitos se podiam ligar a HLA, como se mostrou no exemplo 3. Pelo contrário, o número previsto de sequências que se ligam a epítomos de células T estava significativamente reduzido em Fv3-M73, Fv4-M73 e Fv5-M83. Além disso, a estrutura de Fv3-M73, Fv4-M73 ou Fv5-M83 não tinha sequência de murganho e estava assim completamente humanizada. Isto sugere a possibilidade de o risco de imunogenicidade estar significativamente reduzido em Fv3-M73, Fv4-M73 e Fv5-M83, quando comparado com TOCILIZUMABE.

[Exemplo 8] Ensaio de PK/PD de anticorpos do recetor de IL-6 completamente humanizados em macacos

Administrou-se, intravenosamente, a macacos cinomólogos, uma vez, cada um de TOCILIZUMABE, controlo, Fv3-M73, Fv4-M73 e Fv5-M83, numa dose de 1 mg/kg para avaliar a sua concentração no plasma, ao longo do tempo (ver o exemplo de referência para o processo). A concentração no plasma, ao longo do tempo, de TOCILIZUMABE, Fv3-M73, Fv4-M73 e Fv5-M83, após a administração intravenosa, está ilustrada na fig. 18. O resultado mostrou que cada um de Fv3-M73, Fv4-M73 e Fv5-M83 exibiu uma melhoria significativa da farmacocinética, em macacos cinomólogos, quando comparado com TOCILIZUMABE e com o controlo. Destes, Fv3-M73 e Fv4-M73 exibiram uma farmacocinética altamente melhorada, quando comparado com TOCILIZUMABE.

Avaliou-se a eficácia de cada anticorpo para neutralizar o recetor de IL-6 do tipo membrana de macacos cinomólogos. Administrou-se subcutaneamente IL-6 de macaco cinomólogo na parte inferior das costas, a 5 µg/kg, todos os dias, desde o 6º dia até ao 18º dia após a administração do anticorpo (3º dia ao 10º dia para o TOCILIZUMABE) e determinou-se a concentração de CRP, em cada animal, 24 horas mais tarde (ver o exemplo de referência para o processo). A concentração de CRP, ao longo do tempo, após a administração de cada anticorpo está ilustrada na fig. 19. Para avaliar a eficácia de cada anticorpo para neutralizar o recetor solúvel de IL-6 de macaco cinomólogo, determinou-se a concentração de recetor solúvel de IL-6 de macaco cinomólogo, na forma livre, em macacos cinomólogos e calcularam-se as percentagens de recetor solúvel de IL-6, na forma livre (ver o exemplo de referência para o

processo). A percentagem de recetor de IL-6 solúvel, livre, ao longo do tempo, após a administração de cada anticorpo está ilustrada na fig. 20.

Cada um de Fv3-M73, Fv4-M73 e Fv5-M83 neutralizou o recetor de IL-6 do tipo membrana, de macaco cinomólogo, de uma forma mais sustentada e suprimiu o aumento de CRP, ao longo de um período mais longo, quando comparado com TOCILIZUMABE e com o controlo (o conhecido anticorpo anti-recetor de IL-6 de elevada afinidade). Além disso, cada um de Fv3-M73, Fv4-M73 e Fv5-M83 neutralizou o recetor de IL-6 de macaco cinomólogo, de uma forma mais sustentada e suprimiu o aumento de recetor de IL-6 de macaco cinomólogo, na forma livre, ao longo de um período mais longo, quando comparado com TOCILIZUMABE e com o controlo. Estas observações demonstram que todos os Fv3-M73, Fv4-M73 e Fv5-M83 são superiores para sustentar a neutralização dos recetores solúveis de IL-6 do tipo de membrana em relação a TOCILIZUMABE e ao controlo. Destes, Fv3-M73 e Fv4-M73 são marcadamente superiores para sustentar a neutralização. Entretanto, Fv5-M83 suprimiu CRP e o recetor de IL-6 de macaco cinomólogo, na forma livre, mais fortemente do que Fv3-M73 e Fv4-M73. Assim, considera-se que Fv5-M83 é mais forte do que Fv3-M73, Fv4-M73 e o controlo (o conhecido anticorpo anti-recetor de IL-6 de elevada afinidade) na neutralização dos recetores solúveis de IL-6 do tipo de membrana. Considera-se que os resultados, *in vivo*, de macacos cinomólogos reflete a afinidade maior de Fv5-M83 para o recetor de IL-6 e uma atividade biológica maior de Fv5-M83 no sistema de ensaio de BaF/gp130 relativamente ao controlo.

Estas observações sugerem que Fv3-M73 e Fv4-M73 são bastante superiores a sustentar as suas atividades como

anticorpos de neutralização anti-recetores de IL-6 quando comparado com TOCILIZUMABE e com o controlo e assim permitem reduzir significativamente a dose e a frequência de administração. Além disso, Fv5-M83 demonstrou ser marcadamente superior em termos da força da atividade como anticorpo de neutralização anti-recetores de IL-6, assim como na sustentação da sua atividade. Assim, espera-se que Fv3-M73, Fv4-M73 e Fv5-M83 sejam úteis como produtos farmacêuticos antagonistas de IL-6.

[Exemplo 9]

A proteína quimioatratadora monocítica (PQM)-1 é conhecida por estar envolvida na invasão celular de monócitos, células T, células AN (*assassinats naturels*) e basófilos. A PQM-1 tem sido referida como sendo altamente expressa em tecidos sinoviais/fluido sinovial de doentes com AR (J. Clin. Invest., Set 1992, 90(3): 772-779) e pensa-se que está envolvida em estados clínicos patológicos de AR (Inflamm. Allergy Drug Targets, Mar 2008, 7(1): 53-66).

O FCEV é um fator angiogénico potente e sabe-se que é produzido, por exemplo, por macrófagos, fibroblastos e células sinoviais, na membrana sinovial de doentes com AR (J. Rheumatol., Set 1995, 22(9): 1624-1630). Além disso, o nível de FCEV, no soro de doentes com AR está relacionado com a atividade da doença e a progressão radiográfica (Arthritis Rheum., Jun 2003, 48(6): 1521-1529; e Arthritis Rheum., Set 2001, 44(9): 2055-2064) e o nível de FCEV no soro diminui pelo tratamento de doentes com AR com o anticorpo anti-RIL-6, TOCILIZUMABE; por isso, também se considera que FCEV desempenha um papel importante no estado

clínico patológico da AR (Mod. Rheumatol. 2009, 19(1): 12-19; e Mediators Inflamm. 2008, 2008: 129873).

Assim, examinou-se que TOCILIZUMABE e Fv4-M73 podem inibir PQM-1 e a produção de FCEV a partir de células sinoviais humanas derivadas de doentes com AR que ocorre a partir da estimulação de RIL-6s e IL-6.

Colocaram-se em placas de 96 poços células sinoviais derivadas de doentes humanos com AR (TOYOBO) em meio IMDM contendo FCS a 5 %, a 2×10^4 células/0,05 mL/poço, e colocou-se durante 90 minutos numa incubadora com CO₂ (37 °C, CO₂ a 5 %). Adicionou-se 0,05 mL de TOCILIZUMABE e Fv4-M73 diluídos para concentrações apropriadas, deixaram-se as placas em repouso durante 15 minutos, depois adicionou-se 0,05 mL de recetor solúvel de IL-6 (SR344: preparado de acordo com o processo descrito nos exemplos de referência). As placas foram ainda deixadas em repouso durante 30 minutos e depois adicionou-se 0,05 mL de IL-6 (TORAY) (a concentração final de recetor solúvel de IL-6 e IL-6 foi de 50 ng/mL para cada). Após dois dias de cultura, recolheram-se os sobrenadantes da cultura e mediram-se as concentrações de PQM-1 e de FCEV nos sobrenadantes da cultura utilizando um estojo de ELISA (Biosource and Pierce Biotechnology). Os resultados estão ilustrados nas fig. 21 e 22. TOCILIZUMABE e Fv4-M73 inibiram a produção de PQM-1 e FCEV a partir de células sinoviais derivadas de doentes humanos com AR, no seguimento da estimulação com recetor solúvel de IL-6 e IL-6, de uma forma dependente da concentração.

De acordo com isto, a persistência do efeito de Fv4-M73 como anticorpo de neutralização anti-recetores de IL-6 (o efeito da ligação ao recetor de IL-6 e o bloqueio dos

sinais do recetor solúvel de IL-6 do tipo de membrana e o recetor solúvel de IL-6) é significativamente superior quando comparado com TOCILIZUMABE, a frequência de administração e a dose podem ser bastante reduzidas, quando comparadas com TOCILIZUMABE e, além disso, Fv4-M73 inibe a produção de PQM-1 e FCEV a partir de células sinoviais humanas derivadas de doentes com AR. Por isso, Fv4-M73 tem demonstrado ser um agente terapêutico muito eficaz contra a AR.

Exemplos de referência

Preparação do recetor de IL-6 solúvel, humano e recombinante

O recetor de IL-6 solúvel, humano e recombinante do recetor de IL-6 humano, que é o antigénio, foi produzido, tal como se descreve a seguir. Gerou-se uma linha de células de OHC que expressa constitutivamente um recetor de IL-6 humano contendo uma sequência a partir do 1º ao 344º aminoácidos do terminal N, relatado em J. Biochem. (1990) 108, 673-676 (Yamasaki et al., Science (1988) 241, 825-828 (GenBank #X12830)). Purificou-se o recetor de IL-6 humano solúvel a partir do sobrenadante da cultura de células de OHC que expressam SR344, por meio de três cromatografias em coluna: cromatografias em coluna Blue Sepharose 6 FF, cromatografia de afinidade utilizando uma coluna imobilizada com um anticorpo específico para SR344 e

cromatografia em coluna de filtração em gel. A fração eluída, como pico principal, foi utilizada como a amostra final purificada.

Preparação do recetor de IL-6 solúvel, recombinante (RIL-6c) de macaco cinomólogo

Prepararam-se iniciadores de oligo-ADN com base na sequência de genes descrita para o recetor de IL-6 de macaco Rhesus (Birney et al., Ensembl 2006, Nucleic Acids Res. 2006 Jan 1; 34 (referência na base de dados):D556-61). Preparou-se um fragmento de ADN que codifica todo o gene do recetor de IL-6 de macaco cinomólogo, por meio de RCP, utilizando os iniciadores e, como matriz, ADNc preparado a partir do pâncreas de macaco cinomólogo. O fragmento de ADN resultante foi inserido num vetor de expressão de células de mamífero e preparou-se uma linha de expressão estável de OHC (linha de células de OHC que produz RSIL-6cino) utilizando o vetor. Purificou-se o meio de cultura das células de OHC que produz RSIL-6cino utilizando uma coluna HisTrap (GE Healthcare Bioscience) e depois concentrou-se com Amicon Ultra-15 Ultracel-10k (Millipore). Obteve-se uma amostra final purificada de recetor de IL-6 solúvel de macaco cinomólogo (daqui em diante RIL-6c) através da purificação numa coluna de filtração em gel de Superdex200pgl6/60 (GE Healthcare Bioscience).

Preparação do recetor de IL-6 recombinante de macaco cinomólogo (RIL-6c)

Preparou-se IL-6 de macaco cinomólogo pelo processo que se descreve a seguir. Preparou-se a sequência de nucleótidos que codifica 212 aminoácidos, depositada na SWISSPROT com o No. de acesso P79341 e clonou-se num vetor

de expressão de células de mamífero. Introduziu-se o vetor resultante em células de OHC para preparar uma linha de células de expressão estável (linha de células de OHC que produzem IL-6cino). Purificou-se o meio de cultura das células de OHC que produz IL-6cino utilizando uma coluna SP-Sepharose/FF (GE Healthcare Bioscience) e depois concentrou-se com Amicon Ultra-15 Ultracel-10k (Millipore). Obteve-se uma amostra final purificada de IL-6 de macaco cinomólogo (daqui em diante IL-6c) através de uma nova purificação numa coluna de filtração em gel de Superdex200pg26/60 (GE Healthcare Bioscience), seguida de concentração com Amicon Ultra-15 Ultracel-5k (Millipore).

Preparação de um anticorpo conhecido anti-recetor de IL-6 de elevada afinidade

Preparou-se um vetor de expressão de células de mamífero para expressar VQ8F11-21 hIgG1, um anticorpo conhecido, anti-recetor de IL-6 de elevada afinidade. VQ8F11-21 hIgG1 está descrito na US 2007/0280945 A1 (US 2007/0280945 A1; as sequências de aminoácidos de cadeia P e de cadeia L tal como estabelecidas nas SEQ ID NOs: 77 e 78, respetivamente). A região variável do anticorpo foi construída por RCP utilizando uma combinação de oligo-ADN sintéticos (RCP de junção) e IgG1 para a região constante. Combinaram-se as regiões, variável e constante, do anticorpo, por RCP de junção e depois inseriram-se num vetor de expressão de mamíferos para preparar vetores de expressão de interesse para a cadeia P e a cadeia L. As sequências de nucleótidos dos vetores de expressão resultantes foram determinadas por um processo conhecido dos especialistas na matéria. O anticorpo anti-recetor de

IL-6 de elevada afinidade (daqui em diante abreviado como "controlo") foi expresso e purificado utilizando os vetores de expressão preparados pelo processo descrito no exemplo 1.

Preparação, expressão e purificação de variantes de TOCILIZUMABE

Prepararam-se variantes de TOCILIZUMABE utilizando o estojo de mutagénese dirigido ao sítio QuikChange (Stratagene), de acordo com o processo descrito no manual de instruções em anexo. Os fragmentos de plasmido resultantes foram inseridos em vetores de expressão de células de mamífero para preparar os vetores de expressão para as cadeias P e as cadeias L de interesse. As sequências de nucleótidos dos vetores de expressão obtidas foram determinadas por um processo conhecido dos técnicos na matéria. Os anticorpos foram expressos pelo processo descrito a seguir. Fez-se uma suspensão de uma linha de células HEK293H derivada de cancro do rim embrionário humano (Invitrogen) em DMEM (Invitrogen), completado com soro bovino fetal a 10 % (Invitrogen). Colocaram-se as células em placas, a 10 ml por prato, em pratos para células aderentes (10 cm de diâmetro; CORNING) a uma densidade de células de 5 a 6 x 10⁵ células/ml e fez-se a sua cultura numa incubadora com CO₂ (37 °C, CO₂ a 5 %) durante um dia e uma noite completos. Depois retirou-se o meio por aspiração e adicionou-se 6,9 ml de meio de OHC-S-SFM-II (Invitrogen). Introduziu-se o plasmido preparado em células pelo processo de lipofecção. Recolheram-se os sobrenadantes da cultura resultantes, centrifugaram-se (aproximadamente 2 000 g, 5 min, temperatura ambiente) para eliminar as células e esterilizou-se por filtração através de um filtro de 0 22 µm MILLEX(R)-GV (Millipore) para se

obter os sobrenadantes. Os anticorpos foram purificados a partir dos sobrenadantes obtidos da cultura, por um processo conhecido dos especialistas na matéria, utilizando um fluxo rápido de rProtein A Sepharose™ (Amersham Biosciences). Para determinar a concentração do anticorpo purificado, mediu-se a densidade ótica a 280 nm, utilizando um espectrofotômetro. Calcularam-se as concentrações do anticorpo a partir dos valores determinados utilizando um coeficiente de absorvência calculado pelo processo PACE (Protein Science 1995; 4: 2411-2423).

Estabelecimento de uma linha de células BaF3 que expressa gp130 humano

Estabeleceu-se uma linha de células BaF3 que expressa gp130 humana pelo procedimento descrito a seguir, para se obter uma linha de células que prolifera de uma forma dependente de IL-6.

Amplificou-se um ADNc de gp130 humana, de comprimento completo (Hibi et al., Cell (1990) 63: 1149-1157 (GenBank #NM_002184)) por RCP e clonou-se no vetor de expressão pCOS2Zeok, para preparar pCOS2Zeo/gp130. pCOS2Zeo é um vetor de expressão preparado por eliminação da região de expressão do gene DHFR a partir de pOHCI (Hirata et al., FEBS Letter (1994) 356: 244-248) e inserção da região de expressão do gene de resistência a zeocina. Amplificou-se um ADNc de RIL-6 humano, de comprimento completo, por RCP e clonou-se em pcADN3.1 (+) (Invitrogen) para gerar RIL-6h/pADNc3.1(+).

Misturou-se 10 µg de pCOS2Zeo/gp130 com células BaF3 ($0,8 \times 10^7$ células) suspensas em STF e depois submeteu-se a impulsos a 0,33 kV e 950 µFD utilizando o Gene Pulser (Bio-Rad). Fez-se uma cultura das células BaF3 nas quais tinha sido introduzido o gene por eletroporação, durante um dia e uma noite inteiros, em meio RPMI 1640 (Invitrogen) completado com 0,2 ng/ml de interleucina 3 de murganho (Peprotech) e soro bovino fetal a 10 % (daqui em diante SBF, HyClone) e selecionou-se, por adição de meio RPMI 1640 completado com 100 ng/ml de interleucina 6 humana (R&D systems), 100 ng/ml de recetor solúvel de interleucina 6 humana (R&D systems) e SBF a 10 % para se estabelecer uma linha de células BaF3 que expressa gp130 humana (daqui para a frente "BaF3/gp130"). Esta BaF/gp130 prolifera na presença de interleucina 6 humana (R&D systems) e recetor solúvel de interleucina 6 humana e assim pode-se utilizar para avaliar a atividade de inibição do crescimento (ou a atividade de neutralização do recetor de IL-6) de um anticorpo anti-recetor de IL-6.

Avaliação da atividade biológica por meio de células BaF3 que expressam gp130 humana (BaF/gp130)

Avaliou-se a atividade de neutralização do recetor de IL-6 utilizando BaF3/gp130 que prolifera de uma maneira dependente de IL-6/recetor de IL-6. Após três lavagens, com RPMI1640 completado com SBF a 10 %, fez-se uma suspensão a 5×10^4 células/ml em RPMI1640 completado com 600 ng/ml ou 60 ng/ml de interleucina-6 humana (TORAY) (concentração final de 300 ng/ml ou 30 ng/ml), uma quantidade apropriada de recetor solúvel de interleucina 6 humana e SBF a 10 %. Distribuíram-se as suspensões de células (50 µl/poço) em placas de 96 poços (CORNING). Depois, diluíram-se os anticorpos purificados com RPMI 1640 contendo SBF a 10 % e

adicionou-se a cada poço (50 µl/poço). Fez-se a cultura das células, a 37 °C, em atmosfera de CO₂ a 5 %, durante três dias. Diluiu-se o reagente WST-8, duas vezes, (estojo 8 de contagem de células; Dojindo Laboratories) com SBF. Imediatamente depois adicionou-se, a cada poço, 20 µl do reagente, mediu-se a densidade ótica a 450 nm (comprimento de onda de referência: 620 nm) utilizando SUNRISE CLASSIC (TECAN). Após a cultura, durante duas horas, mediu-se novamente a densidade ótica a 450 nm (comprimento de onda de referência: 620 nm). Avaliou-se a atividade de neutralização do recetor de IL-6 utilizando a alteração da densidade ótica durante duas horas, como indicador.

Análise da ligação ao recetor solúvel de IL-6 humana com base em Biacore

Analizou-se a cinética da reação antigénio-anticorpo utilizando Biacore T100 (GE Healthcare). Mediu-se a interação do anticorpo do recetor solúvel de IL-6 humana por imobilização de quantidades apropriadas de proteína A ou proteína A/G ou F(ab')₂ anti-IgG (específico da cadeia γ) num chip sensor, pelo processo de acoplamento de amina, ligando anticorpos de interesse ao chip, a pH 7,4 e depois fez-se passar recetor solúvel de IL-6 ajustado, a várias concentrações, a pH 7,4 sobre o chip, como analito. Todas as medições foram feitas a 37 °C. Os parâmetros cinéticos, a constante da taxa de associação k_a (1/Ms) e a constante da taxa de dissociação k_d (1/s) foram calculados a partir dos sensogramas obtidos por medição. Depois determinou-se K_D (M) com base nas constantes da taxa. Os parâmetros respetivos foram determinados utilizando o programa informático T100 Evaluation da Biacore (GE Healthcare).

Avaliação da dissociação do recetor de IL-6 do tipo membrana, dependente do pH, utilizando Biacore

A reação antigénio-anticorpo com o recetor de IL-6 do tipo membrana, a pH 5,8 e a pH 7,4 foi observada utilizando T100 da Biacore (GE Healthcare). Avaliou-se a ligação ao recetor de IL-6 do tipo membrana, por meio da avaliação da ligação ao recetor solúvel humano de IL-6 imobilizado no chip sensor. SR344 foi biotinilado por um processo conhecido dos especialistas na matéria. Com base na afinidade entre a biotina e a estreptavidina, imobilizou-se o recetor solúvel humano de IL-6, biotinilado, no chip sensor, por via da estreptavidina. Todas as medições foram feitas a 37 °C. O tampão da fase móvel foi MES 10 mM (pH 5,8), NaCl 150 mM e Tween 20 a 0,05 %. Injetou-se um clone exibindo uma ligação dependente do pH, em condições de pH 7,4 para ligar o recetor solúvel de IL-6 humana (a injeção do tampão de amostra foi de MES 10 mM (pH 7,4), 1NaCl 150 mM e Tween 20 a 0,05 %). Depois, observou-se a dissociação dependente do pH, de cada clone, a pH 5,8, que é o pH da fase móvel. A constante da taxa de dissociação (k_d (1/s)), a pH 5,8, foi calculada utilizando o programa informático T100 Evaluation da Biacore (GE Healthcare) ajustando apenas a fase de dissociação a pH 5,8. A concentração da amostra foi de 0,25 µg/ml. A reação realizou-se em 10 MES 10 mM (pH 7,4), NaCl 150 mM e Tween 20 a 0,05 % e a dissociação realizou-se em MES 10 mM (pH 5,8), NaCl 150 mM e Tween 20 a 0,05 %. Do mesmo modo, a constante da taxa de dissociação (k_d (1/s)), a pH 7,4, foi calculada utilizando o programa informático T100 Evaluation da Biacore (GE Healthcare) ajustando apenas a fase de dissociação a pH 7,4. A concentração da amostra foi de 0,5 µg/ml. A reação realizou-se em 10 MES 10 mM (pH 7,4), NaCl 150 mM e Tween

20 a 0,05 % e a dissociação realizou-se em MES 10 mM (pH 7,4), NaCl 150 mM e Tween 20 a 0,05 %.

Avaliação da ligação a FcRn humano

FcRn é um complexo de FcRn e β 2-microglobulina. Prepararam-se iniciadores de oligo-ADN com base na sequência do gene humano de FcRn descrito (J. Exp. Med. (1994) 180 (6): 2377-2381). Preparou-se um fragmento de ADN que codifica todo o gene, por RCP, utilizando ADNc humano (Human Placenta Marathon-Ready cDNA, Clontech) como matriz e prepararam-se os iniciadores. Utilizando como matriz o fragmento de ADN obtido, amplificou-se, por RCP, um fragmento de ADN que codifica o domínio extracelular contendo a região de sinal (Met1-Leu290) e inseriu-se num vetor de expressão de células de mamífero (sequência de aminoácidos de FcRn humano, conforme estabelecido na SEQ ID NO: 79). Do mesmo modo, prepararam-se iniciadores de oligo-ADN com base na sequência do gene humano de β 2-microglobulina (Proc. Natl. Acad. Sci., EUA. (2002) 99 (26): 16899-16903). Preparou-se um fragmento de ADN que codifica todo o gene, por RCP, utilizando ADNc humano (Human Placenta Marathon-Ready cDNA, Clontech) como matriz e prepararam-se os iniciadores. Utilizando o fragmento de ADN obtido, como matriz, amplificou-se, por RCP, um fragmento de ADN que codifica toda a β 2-microglobulina domínio contendo a região de sinal (Met1-Leu119) e inseriu-se num vetor de expressão de células de mamífero (sequência de aminoácidos de β 2-microglobulin humana, conforme estabelecido na SEQ ID NO: 80).

O FcRn humano foi expresso pelo procedimento que se segue. Introduziram-se os plasmídeos, preparados para FcRn e β 2-microglobulina humanos, em células da linha de células

derivadas de cancro humano embrionário do rim, HEK293H (Invitrogen), utilizando SBF a 10 % (Invitrogen), por lipofecção. Recolheu-se o sobrenadante da cultura resultante e purificou-se FcRn utilizando IgG, sefarose 6 de fluxo rápido (Amersham Biosciences) pelo processo descrito em J. Immunol. 1 Nov 2002; 169(9): 5171-80, seguido de mais purificação utilizando HiTrap Q HP (GE Healthcare).

Determinação da concentração do anticorpo em plasma de murganho

Determinaram-se as concentrações do anticorpo no plasma de murganho, por ELISA, de acordo com um processo conhecido pelos especialistas na matéria.

Ensaio de PK/PD para determinar a concentração de anticorpo no plasma, a concentração de CRP e o recetor solúvel de IL-6 livre em macacos

Determinaram-se as concentrações no plasma, em macacos cinomólogos, por ELISA, utilizando um processo conhecido pelos especialistas na matéria.

Determinou-se a concentração de CRP num analisador automático (TBA-120FR; Toshiba Medical Systems Co.) utilizando Cias R CRP (KANTO CHEMICAL CO., INC.).

Determinou-se a concentração do recetor solúvel, livre, de IL-6 de macaco cinomólogo, no plasma de macacos cinomólogos pelo procedimento descrito a seguir. Todos os anticorpos do tipo IgG (IgG de macaco cinomólogo, anticorpo anti-recetor de IL-6 humano e complexo de anticorpo anti-recetor de IL-6 humano - recetor de IL-6 de macaco cinomólogo) no plasma foram adsorvidos em proteína A pela carga de 30 µl de plasma de macaco cinomólogo, numa

quantidade apropriada de resina de fluxo rápido de R-proteína A e sefarose (GE Healthcare), seco num copo de filtro de 0,22 µm (Millipore). Depois, centrifugou-se a solução num copo utilizando uma centrifugadora de alta velocidade para recolher a solução que tinha passado através dele. A solução que passou não continha complexo de anticorpo anti-recetor de IL-6 humano - recetor de IL-6 de macaco cinomólogo ligado à proteína A. Por isso, pode-se determinar a concentração do recetor solúvel de IL-6 livre medindo de macaco cinomólogo na solução que passou através da proteína A. A concentração do recetor solúvel de IL-6 de macaco cinomólogo foi determinada utilizando um processo conhecido pelos especialistas na matéria para a medição de concentrações de recetor solúvel de IL-6 humana. Utilizou-se como padrão o recetor solúvel de IL-6 de macaco cinomólogo (RIL-6c) preparado como se descreveu antes. A percentagem de recetor solúvel de IL-6 livre foi calculada pela fórmula que se segue.

$$\frac{\text{Concentração de recetor solúvel de IL-6 livre, após a administração do anticorpo}}{\text{Concentração de recetor solúvel de IL-6 antes da administração do anticorpo}} \times 100$$

LISTA DE SEQUÊNCIAS

<110> CHUGAI SEIYAKU KABUSHIKI KAISHA

<120> Moléculas de anticorpos melhoradas

<130> C1-A0805Y2P

<150> JP 2008-248213

<151> 26-09-2008

<150> JP 2009-60806

<151> 13-03-2009

<150> JP 2009-67925

<151> 19-03-2009

<160> 117

<170> PatentIn versão 3.4

<210> 1

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Uma sequência de polipéptido sintetizada artificialmente

<400> 1

His Asp His Ala Trp Ser
1 5

<210> 2

<211> 16

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Uma sequência de polipéptido sintetizada artificialmente

<400> 2

Phe Ile Ser Tyr Ser Gly Ile Thr Asn Tyr Asn Pro Thr Leu Gln Gly
1 5 10 15

<210> 3

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Uma sequência de polipeptido sintetizada artificialmente

<400> 3

Ser	Leu	Ala	Arg	Thr	Thr	Ala	Met	Asp	Tyr
1				5					10

<210> 4

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Uma sequência de polipeptido sintetizada artificialmente

<400> 4

His	Asp	His	Ala	Trp	Ser
1				5	

<210> 5

<211> 16

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Uma sequência de polipeptido sintetizada artificialmente

<400> 5

Phe	Ile	Ser	Tyr	Ser	Gly	Ile	Thr	Asn	Tyr	Asn	Pro	Ser	Leu	Gln	Gly
1				5					10					15	

<210> 6

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Uma sequência de polipéptido sintetizada artificialmente

<400> 6

Ser	Leu	Ala	Arg	Thr	Thr	Ala	Met	Asp	Tyr
1				5					10

<210> 7

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Uma sequência de polipéptido sintetizada artificialmente

<400> 7

Asp	Asp	His	Ala	Val	Ser
1				5	

<210> 8

<211> 16

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Uma sequência de polipéptido sintetizada artificialmente

<400> 8

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

1

5

10

15

<210> 9

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Uma sequência de polipéptido sintetizada artificialmente

<400> 9

Leu Leu Ala Arg Ala Thr Ala Met Asp Val

1

5

10

<210> 10

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Uma sequência de polipéptido sintetizada artificialmente

<400> 10

Gln	Ala	Ser	Arg	Asp	Ile	Ser	Ser	His	Leu	Asn
1				5					10	

<210> 11

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Uma sequência de polipéptido sintetizada artificialmente

<400> 11

Tyr	Gly	Ser	His	Leu	Leu	Ser
1				5		

<210> 12

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Uma sequência de polipéptido sintetizada artificialmente

<400> 12

Gly	Gln	Gly	Asn	Arg	Leu	Pro	Tyr	Thr
1				5				

<210> 13

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Uma sequência de polipéptido sintetizada artificialmente

<400> 13

Gln	Ala	Ser	Thr	Asp	Ile	Ser	Ser	His	Leu	Asn
1				5					10	

<210> 14

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Uma sequência de polipéptido sintetizada artificialmente

<400> 14

Tyr	Gly	Ser	His	Leu	Leu	Ser
1				5		

<210> 15

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Uma sequência de polipéptido sintetizada artificialmente

<400> 15

Gly Gln Gly Asn Arg Leu Pro Tyr Thr
1 5

<210> 16

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Uma sequência de polipéptido sintetizada artificialmente

<400> 16

Gln Ala Ser Gln Asp Ile Ser Ser Tyr Leu Asn
1 5 10

<210> 17

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Uma sequência de polipéptido sintetizada artificialmente

<400> 17

Tyr Gly Ser Glu Leu Glu Ser
1 5

<210> 18

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Uma sequência de polipéptido sintetizada artificialmente

<400> 18

Gly Gln Gly Asn Arg Leu Pro Tyr Thr
1 5

<210> 19

<211> 119

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Uma sequência de polipéptido sintetizada artificialmente

<400> 19

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

<210> 20

<211> 119

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Uma sequência de polipéptido sintetizada artificialmente

<400> 20

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

<210> 21

<211> 119

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Uma sequência de polipeptido sintetizada artificialmente

<400> 21

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

<210> 22

<211> 107

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Uma sequência de polipéptido sintetizada artificialmente

<400> 22

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

Asp Ser Val Thr Ile Thr Cys Gln Ala Ser Arg Asp Ile Ser Ser His
 20 25 30

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

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

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

Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gly Gln Gly Asn Arg Leu Pro Tyr
 85 90 95

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

<210> 23

<211> 107

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Uma sequência de polipéptido sintetizada artificialmente

<400> 23

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

Asp Ser Val Thr Ile Thr Cys Gln Ala Ser Thr Asp Ile Ser Ser His
 20 25 30

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

<210> 24

<211> 107

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Uma sequência de polipéptido sintetizada artificialmente

<400> 24

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

<210> 25

<211> 443

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Uma sequência de polipeptido sintetizada
artificialmente

<400> 25

Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu
 1 5 10 15
 Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ala Val Ser Gly His Ser Ile Ser His Asp
 20 25 30
 His Ala Trp Ser Trp Val Arg Gln Pro Pro Gly Glu Gly Leu Glu Trp
 35 40 45
 Ile Gly Phe Ile Ser Tyr Ser Gly Ile Thr Asn Tyr Asn Pro Thr Leu
 50 55 60
 Gln Gly Arg Val Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Ser Leu Ala Arg Thr Thr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Glu Gly
 100 105 110
 Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe
 115 120 125
 Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu
 130 135 140
 Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp
 145 150 155 160
 Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu
 165 170 175
 Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser
 180 185 190
 Ser Asn Phe Gly Thr Gln Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro
 195 200 205
 Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Thr Val Glu Arg Lys Ser Cys Val Glu
 210 215 220
 Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Pro Val Ala Gly Pro Ser Val Phe Leu
 225 230 235 240
 Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu
 245 250 255

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

<210> 26

<211> 443

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Uma sequência de polipéptido sintetizada artificialmente

<400> 26

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

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ala Val Ser Gly His Ser Ile Ser His Asp

107

Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Phe Arg Val Val Ser Val Leu
 290 295 300
 Thr Val Val His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys
 305 310 315 320
 Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys
 325 330 335
 Thr Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser
 340 345 350
 Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys
 355 360 365
 Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln
 370 375 380
 Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Met Leu Asp Ser Asp Gly
 385 390 395 400
 Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln
 405 410 415
 Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Ala
 420 425 430
 His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
 435 440

<210> 27

<211> 447

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Uma sequência de polipéptido sintetizada artificialmente

<400> 27

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

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

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

Ile Gly Phe Ile Ser Tyr Ser Gly Ile Thr Asn Tyr Asn Pro Thr Leu

50	55	60
Gln Asp Arg Val Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr 65 70 75 80		
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys 85 90 95		
Ala Arg Leu Leu Ala Arg Ala Thr Ala Met Asp Val Trp Gly Glu Gly 100 105 110		
Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe 115 120 125		
Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu 130 135 140		
Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp 145 150 155 160		
Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu 165 170 175		
Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser 180 185 190		
Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro 195 200 205		
Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys 210 215 220		
Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro 225 230 235 240		
Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser 245 250 255		
Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp 260 265 270		
Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn 275 280 285		
Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val 290 295 300		
Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu 305 310 315 320		

Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys
 325 330 335
 Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr
 340 345 350
 Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr
 355 360 365
 Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu
 370 375 380
 Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu
 385 390 395 400
 Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys
 405 410 415
 Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu
 420 425 430
 Ala Leu His Ala His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
 435 440 445

<210> 28

<211> 214

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Uma sequência de polipéptido sintetizada artificialmente

<400> 28

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

<210> 29

<211> 214

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Uma sequência de polipéptido sintetizada artificialmente

<400> 29

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

Asp Ser Val Thr Ile Thr Cys Gln Ala Ser Thr Asp Ile Ser Ser His
20      25      30

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

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

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

Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gly Gln Gly Asn Arg Leu Pro Tyr
85      90      95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Glu Arg Thr Val Ala Ala
100     105     110

Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
115     120     125

Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
130     135     140

Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
145     150     155     160

Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
165     170     175

Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
180     185     190

Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
195     200     205

Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210
```

<210> 30

<211> 214

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Uma sequência de polipeptido sintetizada
artificialmente

<400> 30

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

<210> 31

<211> 324

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Uma sequência de polipéptido sintetizada artificialmente

<400> 31

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

Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
 85 90 95
 Thr Val Glu Arg Lys Ser Cys Val Glu Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro
 100 105 110
 Pro Val Ala Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp
 115 120 125
 Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp
 130 135 140
 Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly
 145 150 155 160
 Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn
 165 170 175
 Ser Thr Phe Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Val His Gln Asp Trp
 180 185 190
 Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro
 195 200 205
 Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Thr Lys Gly Gln Pro Arg Glu
 210 215 220
 Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn
 225 230 235 240
 Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile
 245 250 255
 Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr
 260 265 270
 Thr Pro Pro Met Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys
 275 280 285
 Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys
 290 295 300
 Ser Val Met His Glu Ala Leu His Ala His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu
 305 310 315 320
 Ser Leu Ser Pro

<210> 32

<211> 324

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Uma sequência de polipéptido sintetizada artificialmente

<400> 32

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

Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn
 225 230 235 240

Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile
 245 250 255

Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr
 260 265 270

Thr Pro Pro Met Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys
 275 280 285

Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys
 290 295 300

Ser Val Met His Glu Ala Leu His Ala His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu
 305 310 315 320

Ser Leu Ser Pro

<210> 33

<211> 328

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Uma sequência de polipéptido sintetizada artificialmente

<400> 33

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

Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu
 225 230 235 240
 Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
 245 250 255
 Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
 260 265 270
 Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
 275 280 285
 Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
 290 295 300
 Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Ala His Tyr Thr
 305 310 315 320
 Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
 325

<210> 34

<211> 107

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Uma sequência de polipéptido sintetizada artificialmente

<400> 34

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

<210> 35

<211> 107

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Uma sequência de polipéptido sintetizada artificialmente

<400> 35

Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu
 1 5 10 15

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

Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln
 35 40 45

Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser
 50 55 60

Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu
 65 70 75 80

Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser
 85 90 95

Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 100 105

<210> 36

<211> 107

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Uma sequência de polipéptido sintetizada artificialmente

<400> 36

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

<210> 37

<211> 327

<212> ADN

<213> Homo sapiens.

<400> 37

cgtacgggtgg ctgcaccatc tgtcttcac cttcccgccat ctgatgagca gttgaaatct 60
 ggaactgcct ctgttgtgtg cctgctgaat aactttctat ccagagagggc caaagtacag 120
 tggaaggtgg ataacgcctt ccaatcgggt aactcccagg agagtgtcac agagcaggac 180
 agcaaggaca gcacctacag cctcagcagc accctgacgc tgagcaaagc agactacgag 240
 aaacacaaag tctacgcctg cgaagtcacc catcaggggc tgagctcgcc cgtcacaaag 300
 agcttcaaca ggggagagtg ttgataa 327

<210> 38

<211> 107

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 38

Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu
 1 5 10 15

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

Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln
 35 40 45

Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser
 50 55 60

Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu
 65 70 75 80

Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser
 85 90 95

Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 100 105

<210> 39

<211> 990

<212> ADN

<213> Homo sapiens.

<400> 39

gctagcacca agggcccatc ggtcttcccc ctggcaccct cctccaagag cactctctggg	60
ggcacagcgg ccctgggctg cctgggtcaag gactacttcc ccgaaccggt gacgggtgtcg	120
tggaaactcag gcgccctgac cagcggcgtg cacaccttcc cggctgtcct acagtctcca	180
ggactctact ccctcagcag cgtgggtgacc gtgccctcca gcagcttggg caccagacc	240
tacatctgca acgtgaatca caagcccagc aacaccaagg tggacaagaa agttgagccc	300
aaatcttctg aaaaaactca cacatgccca ccgtgccag cactgaact cctgggggga	360
ccgtcagttc tcctcttccc cccaaaacc aaggacaccc tcctgatctc cgggacctt	420
gaggtcacat gcgtgggtgt ggacgtgagc cagcaagacc ctgaggtcaa gttcaactgg	480
tacgtggacg gcgtggaggt gcataatgcc aagacaaagc cgggggagga gcagtacaac	540
agcacgtacc gtgtgggtcag cgtcctcacc gtctgcacc aggaactggct gaatggcaag	600
gagtacaagt gcaaggtctc caacaaagcc ctcccagccc ccctcgagaa aacctctcc	660
aaagccaaag ggcagccccc agaaccacag gtgtacaccc tgcacctc cgggatgag	720
ctgaccaaga accaggtcag cctgacctgc ctgggtcaaag gcttctatcc cagcgacatc	780
gccgtggagt gggagagcaa tgggcagccc gagaacaact acaagaccac gcctcccggtg	840
ctggactccg acggctcctt ctctctctac agcaagctca ccgtggacaa gaggcgggtg	900
cagcagggga acgtcttctc atgctccgtg atgcatgagg ctctgcacaa ccactacacg	960
cagaagagcc tctccctgtc tccgggtaaa	990

<210> 40

<211> 330

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 40

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

Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly
 210 215 220
 Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu
 225 230 235 240
 Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
 245 250 255
 Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
 260 265 270
 Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
 275 280 285
 Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
 290 295 300
 Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
 305 310 315 320
 Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 325 330

<210> 41

<211> 984

<212> ADN

<213> Homo sapiens.

<400> 41

gctagcacca agggcccatc ggtcttcccc ctggcgccct cctccaagag cacctccgag	60
agcacagcgg ccctgggctg cctgggcaag gactacttcc ccgaaccggt gacgggtgtcg	120
tggaaactcag gcgctctgac cagcggcggt cacaccttcc cggctgtect acagtcctca	180
ggactctact ccctcagcag cgtgggtgacc gtgcctctca gcaacttcgg caccagacc	240
tacacctgca acgtagatca caagcccgac aacaccaagg tggacaagac agttgagcgc	300
aaatcttgtg tcgagtgcgc accgtgcaca gcaccacctg tggcaggacc gtcagtcttc	360
ctcttcccc caaaacccaa ggacacctc atgatctccc ggacctctga ggtcacgtgc	420
gtgggtgtgg acgtgagcca cgaagacccc gaggtccagt tcaactggtc cgtggacggc	480
gtggaggtgc ataatgcaa gacaaagcca cgggaggagc agttcaacag cacgttccgt	540
gtggtcagcg tcctcacctg cgtgcaccag gactggctga acggcaagga gtacaagtgc	600
aaggtctcca acaaaggcct ccagccccc atcgagaaaa ccattctcaa aaccaagggg	660
cagccccgag aaccacaggt gtacacctg ccccatccc gggaggagat gaccaagaac	720
caggtcagcc tgacctgct ggtcaaaggc ttctaccca gcgacatcg cgtggagtgg	780
gagagcaatg ggcagccgga gaacaactac aagaccacac ctccatgct ggactccgac	840
ggctccttct tcctctacag caagctcacc gtggacaaga gcaggtggca gcaggggaac	900
gtcttctcat gctccgtgat gcatgaggct ctgcacaacc actacacaca gaagagcctc	960
tcctgtctc cgggtaaatg ataa	984

<210> 42

<211> 326

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 42

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

Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro
 195 200 205
 Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Thr Lys Gly Gln Pro Arg Glu
 210 215 220
 Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn
 225 230 235 240
 Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile
 245 250 255
 Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr
 260 265 270
 Thr Pro Pro Met Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys
 275 280 285
 Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys
 290 295 300
 Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu
 305 310 315 320
 Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 325

<210> 43

<211> 995

<212> ADN

<213> Homo sapiens.

<400> 43

gctagcacca agggcccata cgtcttcccc ctggcgccct gctccaggag cacctccgag	60
agcacagccg ccctgggctg cctgggtcaag gactacttcc ccgaaccggg gacgggtgtcg	120
tggaaactcag gcgccttgac cagcggcggtg cacaccttcc cggtgtcct acagtctca	180
ggactctact cctcagcag cgtgggtgacc gtgccctcca gcagcttggg cacgaagacc	240
tacacctgca acgtagatca caagcccagc aacaccaagg tggacaagag agttgagtcc	300
aaatatggtc ccccatgccc accatgccc gcacctgagt tctgggggg accatcagtc	360
ttctgttcc ccccaaaacc caaggacact ctcatgatct cccggacccc tgaggtcacg	420
tgcgtgggtg tggacgtgag ccaggaagac cccgaggtcc agttcaactg gtacgtggat	480
ggcgtggagg tgcataatgc caagacaaag ccgcggggagg agcagttcaa cagcacgtac	540
cgtgtggtca gcgtcctcac cgtcctgcac caggactggc tgaacggcaa ggagtacaag	600
tgaaggtct ccaacaaagg cctcccgtcc tccatcgaga aaaccatctc caaagccaaa	660
gggcagcccc gagagccaca ggtgtacacc ctgcccccat cccaggagga gatgaccaag	720
aaccagggtca gcctgacctg cctgggtcaaa ggcttctacc ccagcgacat cgcctggag	780
tgggagagca atgggcagcc ggagaacaac tacaagacca cgctcccggt gctggactcc	840
gacggctcct tcttctcta cagcaggcta accgtggaca agagcagggtg gcaggagggg	900
aatgtcttct catgctcgt gatgcatgag gctctgcaca accactacac acagaagagc	960
ctctccctgt ctctgggtta atgataagcg gcgcg	995

<210> 44

<211> 326

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 44

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

Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu
195 200 205

Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg
210 215 220

Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys
225 230 235 240

Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp
245 250 255

Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys
260 265 270

Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser
275 280 285

Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser
290 295 300

Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser
305 310 315 320

Leu Ser Leu Ser Leu Gly
325

<210> 45

<211> 4

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Uma sequência de polipéptido sintetizada artificialmente

<400> 45

Gly Gly Gly Ser
1

<210> 46

<211> 4

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Uma sequência de polipéptido sintetizada artificialmente

<400> 46

Ser Gly Gly Gly
1

<210> 47

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Uma sequência de polipéptido sintetizada artificialmente

<400> 47

Gly Gly Gly Gly Ser
1 5

<210> 48

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Uma sequência de polipéptido sintetizada artificialmente

<400> 48

Ser Gly Gly Gly Gly
1 5

<210> 49

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Uma sequência de polipéptido sintetizada artificialmente

<400> 49

Gly Gly Gly Gly Gly Ser
1 5

<210> 50

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Uma sequência de polipéptido sintetizada artificialmente

<400> 50

Ser Gly Gly Gly Gly Gly
1 5

<210> 51

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Uma sequência de polipéptido sintetizada artificialmente

<400> 51

Gly Gly Gly Gly Gly Gly Ser
1 5

<210> 52

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Uma sequência de polipéptido sintetizada artificialmente

<400> 52

Ser Gly Gly Gly Gly Gly Gly
1 5

<210> 53

<211> 449

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Uma sequência de polipéptido sintetizada artificialmente

<400> 53

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

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

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

Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser
 180 185 190

Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro
 195 200 205

Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys
 210 215 220

Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro
 225 230 235 240

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

Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp
 260 265 270

Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn
 275 280 285

Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val
 290 295 300

Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu
 305 310 315 320

Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys
 325 330 335

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

Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr
 355 360 365

Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu
 370 375 380

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

Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys
405 410 415

Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu
420 425 430

Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
435 440 445

Lys

<210> 54

<211> 214

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Uma sequência de polipéptido sintetizada artificialmente

<400> 54

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

<210> 55

<211> 449

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Uma sequência de polipéptido sintetizada artificialmente

<400> 55

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

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

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

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

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

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

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

Ser Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe
115         120         125

Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu
130         135         140

Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp
145         150         155         160
```

Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu
 165 170 175
 Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser
 180 185 190
 Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro
 195 200 205
 Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys
 210 215 220
 Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro
 225 230 235 240
 Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser
 245 250 255
 Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp
 260 265 270
 Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn
 275 280 285
 Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val
 290 295 300
 Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu
 305 310 315 320
 Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys
 325 330 335
 Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr
 340 345 350
 Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr
 355 360 365
 Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu
 370 375 380
 Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu
 385 390 395 400
 Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys
 405 410 415

Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu
420 425 430

Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
435 440 445

Lys

<210> 56

<211> 214

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Uma sequência de polipéptido sintetizada artificialmente

<400> 56

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

<210> 57

<211> 449

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Uma sequência de polipéptido sintetizada artificialmente

<400> 57

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

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

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

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

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

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

Ala Arg Ser Leu Ala Arg Thr Thr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Glu Gly
100      105      110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe
115      120      125

Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu
130      135      140

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

Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu
```

					165					170					175
Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val	Pro	Ser
			180					185					190		
Ser	Ser	Leu	Gly	Thr	Gln	Thr	Tyr	Ile	Cys	Asn	Val	Asn	His	Lys	Pro
		195					200					205			
Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Lys	Val	Glu	Pro	Lys	Ser	Cys	Asp	Lys
		210				215					220				
Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Leu	Leu	Gly	Gly	Pro
225					230					235					240
Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser
			245						250					255	
Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	His	Glu	Asp
			260					265					270		
Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn
		275					280					285			
Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Tyr	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val
	290					295					300				
Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu
305					310					315					320
Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Ala	Leu	Pro	Ala	Pro	Ile	Glu	Lys
			325						330					335	
Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr
			340					345					350		
Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	Asp	Glu	Leu	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Thr
		355					360					365			
Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu
	370					375					380				
Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Val	Leu
385				390						395					400
Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	Leu	Tyr	Ser	Lys	Leu	Thr	Val	Asp	Lys
			405						410					415	
Ser	Arg	Trp	Gln	Gln	Gly	Asn	Val	Phe	Ser	Cys	Ser	Val	Met	His	Glu
			420					425					430		

Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
435 440 445

Ly8

<210> 58

<211> 214

<212> PRT

<213> Artificial

 $\langle 220 \rangle$

<223> Uma sequência de polipéptido sintetizada artificialmente

<400> 58

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

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

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

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

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

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

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Glu Arg Thr Val Ala Ala
100 105 110

Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
115 120 125

Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
130 135 140

Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
145 150 155 160

Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
165 170 175

Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr

180

185

190

Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
195 200 205

Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210

<210> 59

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Uma sequência de polipéptido sintetizada artificialmente

<400> 59

Tyr Thr Ser Arg Leu His Ser
1 5

<210> 60

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Uma sequência de polipéptido sintetizada artificialmente

<400> 60

Tyr Gly Ser Glu Leu His Ser
1 5

<210> 61

<211> 30

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Uma sequência de polipéptido sintetizada artificialmente

<400> 61

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

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

<210> 62

<211> 30

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Uma sequência de polipéptido sintetizada artificialmente

<400> 62

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

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

<210> 63

<211> 32

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Uma sequência de polipéptido sintetizada artificialmente

<400> 63

Arg	Val	Thr	Met	Leu	Arg	Asp	Thr	Ser	Lys	Asn	Gln	Phe	Ser	Leu	Arg
1				5				10						15	

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

<210> 64

<211> 32

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Uma sequência de polipéptido sintetizada artificialmente

<400> 64

Arg	Val	Thr	Ile	Ser	Arg	Asp	Asn	Ser	Lys	Asn	Thr	Leu	Tyr	Leu	Gln
1				5				10						15	

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

<210> 65

<211> 30

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Uma sequência de polipéptido sintetizada artificialmente

<400> 65

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

Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro
 225 230 235 240

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

Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp
 260 265 270

Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn
 275 280 285

Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val
 290 295 300

Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu
 305 310 315 320

Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys
 325 330 335

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

Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr
 355 360 365

Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu
 370 375 380

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

Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys
 405 410 415

Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu
 420 425 430

Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
 435 440 445

Lys

<210> 67

<211> 214

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Uma sequência de polipéptido sintetizada artificialmente

<400> 67

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

Asp Ser Val Thr Ile Thr Cys Gln Ala Ser Gln His Ile Ser Ser His
20 25 30

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

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

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

Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gly Gln Gly Asn Arg Leu Pro Tyr
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Glu Arg Thr Val Ala Ala
100 105 110

Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
115 120 125

Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
130 135 140

Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
145 150 155 160

Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
165 170 175

Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
180 185 190

Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
195 200 205

Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210

<210> 68

<211> 448

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Uma sequência de polipeptido sintetizada
artificialmente

<400> 68

Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Arg Pro Ser Gln
 1 5 10 15
 Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Tyr Ser Ile Thr Ser Asp
 20 25 30
 His Ala Trp Ser Trp Val Arg Gln Pro Pro Gly Arg Gly Leu Glu Trp
 35 40 45
 Ile Gly Tyr Ile Ser Tyr Ser Gly Ile Thr Thr Tyr Asn Pro Ser Leu
 50 55 60
 Lys Ser Arg Val Thr Met Leu Arg Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser
 65 70 75 80
 Leu Arg Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Ser Leu Ala Arg Thr Thr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
 100 105 110
 Ser Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe
 115 120 125
 Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu
 130 135 140
 Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp
 145 150 155 160
 Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu
 165 170 175
 Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser
 180 185 190
 Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro
 195 200 205
 Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys
 210 215 220
 Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro
 225 230 235 240

Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser
 245 250 255
 Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp
 260 265 270
 Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn
 275 280 285
 Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val
 290 295 300
 Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu
 305 310 315 320
 Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys
 325 330 335
 Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr
 340 345 350
 Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr
 355 360 365
 Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu
 370 375 380
 Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu
 385 390 395 400
 Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys
 405 410 415
 Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu
 420 425 430
 Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
 435 440 445

<210> 69

<211> 447

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Uma sequência de polipéptido sintetizada artificialmente

<400> 69

Gln	Val	Gln	Leu	Gln	Glu	Ser	Gly	Pro	Gly	Leu	Val	Arg	Pro	Ser	Gln	1	5	10	15
Thr	Leu	Ser	Leu	Thr	Cys	Thr	Val	Ser	Gly	Tyr	Ser	Ile	Thr	Ser	Asp	20	25	30	
His	Ala	Trp	Ser	Trp	Val	Arg	Gln	Pro	Pro	Gly	Arg	Gly	Leu	Glu	Trp	35	40	45	
Ile	Gly	Tyr	Ile	Ser	Tyr	Ser	Gly	Ile	Thr	Thr	Tyr	Asn	Pro	Ser	Leu	50	55	60	
Lys	Ser	Arg	Val	Thr	Met	Leu	Arg	Asp	Thr	Ser	Lys	Asn	Gln	Phe	Ser	65	70	75	80
Leu	Arg	Leu	Ser	Ser	Val	Thr	Ala	Ala	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	85	90	95	
Ala	Arg	Ser	Leu	Ala	Arg	Thr	Thr	Ala	Met	Asp	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	100	105	110	
Ser	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	115	120	125	
Pro	Leu	Ala	Pro	Ser	Ser	Lys	Ser	Thr	Ser	Gly	Gly	Thr	Ala	Ala	Leu	130	135	140	
Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val	Ser	Trp	145	150	155	160
Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala	Val	Leu	165	170	175	
Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val	Pro	Ser	180	185	190	
Ser	Ser	Leu	Gly	Thr	Gln	Thr	Tyr	Ile	Cys	Asn	Val	Asn	His	Lys	Pro	195	200	205	
Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Lys	Val	Glu	Pro	Lys	Ser	Cys	Asp	Lys	210	215	220	
Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Leu	Leu	Gly	Gly	Pro	225	230	235	240
Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	245	250	255	
Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	His	Glu	Asp	260	265	270	

Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn
 275 280 285

Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val
 290 295 300

Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu
 305 310 315 320

Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys
 325 330 335

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

Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr
 355 360 365

Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu
 370 375 380

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

Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys
 405 410 415

Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu
 420 425 430

Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
 435 440 445

<210> 70

<211> 445

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Uma sequência de polipéptido sintetizada artificialmente

<400> 70

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

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

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

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

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

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

Ala Arg Ser Leu Ala Arg Thr Thr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
 100 105 110

Ser Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe
 115 120 125

Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu
 130 135 140

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

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

Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser
 180 185 190

Ser Asn Phe Gly Thr Gln Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro
 195 200 205

Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Thr Val Glu Arg Lys Ser Cys Val Glu
 210 215 220

Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Pro Val Ala Gly Pro Ser Val Phe Leu
 225 230 235 240

Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu
 245 250 255

Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Gln
 260 265 270

Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys
 275 280 285

Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Phe Arg Val Val Ser Val Leu
 290 295 300

Thr Val Val His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys
 305 310 315 320

Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys
 325 330 335

Thr Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser
 340 345 350

Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys
 355 360 365

Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln
 370 375 380

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

Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln
 405 410 415

Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn
 420 425 430

His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 435 440 445

<210> 71

<211> 445

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Uma sequência de polipéptido sintetizada artificialmente

<400> 71

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

Leu Arg Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Ser Leu Ala Arg Thr Thr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
 100 105 110
 Ser Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe
 115 120 125
 Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu
 130 135 140
 Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp
 145 150 155 160
 Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu
 165 170 175
 Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser
 180 185 190
 Ser Asn Phe Gly Thr Gln Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro
 195 200 205
 Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Thr Val Glu Arg Lys Cys Cys Val Glu
 210 215 220
 Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Pro Val Ala Gly Pro Ser Val Phe Leu
 225 230 235 240
 Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu
 245 250 255
 Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Gln
 260 265 270
 Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys
 275 280 285
 Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Phe Arg Val Val Ser Val Leu
 290 295 300
 Thr Val Val His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys
 305 310 315 320
 Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys
 325 330 335

Thr Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser
 340 345 350

Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys
 355 360 365

Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln
 370 375 380

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

Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln
 405 410 415

Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn
 420 425 430

His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 435 440 445

<210> 72

<211> 443

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Uma sequência de polipéptido sintetizada artificialmente

<400> 72

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

Ser Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe
 115 120 125

Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu
 130 135 140

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

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

Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser
 180 185 190

Ser Asn Phe Gly Thr Gln Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro
 195 200 205

Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Thr Val Glu Arg Lys Ser Cys Val Glu
 210 215 220

Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Pro Val Ala Gly Pro Ser Val Phe Leu
 225 230 235 240

Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu
 245 250 255

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

Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys
 275 280 285

Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Phe Arg Val Val Ser Val Leu
 290 295 300

Thr Val Val His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys
 305 310 315 320

Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys
 325 330 335

Thr Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser
 340 345 350

Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys
 355 360 365

Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln
 370 375 380

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

Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln
 405 410 415

Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn
 420 425 430

His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
 435 440

<210> 73

<211> 449

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Uma sequência de polipéptido sintetizada artificialmente

<400> 73

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

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

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

Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser
 180 185 190

Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro
 195 200 205

Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys
 210 215 220

Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro
 225 230 235 240

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

Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp
 260 265 270

Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn
 275 280 285

Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val
 290 295 300

Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu
 305 310 315 320

Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys
 325 330 335

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

Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr
 355 360 365

Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu
 370 375 380

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

Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys
405 410 415

Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu
420 425 430

Ala Leu His Ala His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
435 440 445

Lys

<210> 74

<211> 447

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Uma sequência de polipéptido sintetizada
artificialmente

<400> 74

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

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

Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser
 180 185 190

Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro
 195 200 205

Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys
 210 215 220

Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro
 225 230 235 240

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

Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp
 260 265 270

Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn
 275 280 285

Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val
 290 295 300

Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu
 305 310 315 320

Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys
 325 330 335

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

Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr
 355 360 365

Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu
 370 375 380

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

Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys
 405 410 415

Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu
420 425 430

Ala Leu His Ala His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
435 440 445

<210> 75

<211> 443

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Uma sequência de polipéptido sintetizada
artificialmente

<400> 75

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

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

<210> 76

<211> 449

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Uma sequência de polipéptido sintetizada artificialmente

<400> 76

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

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

Lys

<210> 77

<211> 446

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Uma sequência de polipéptido sintetizada artificialmente

<400> 77

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Arg
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Arg Phe Thr Phe Asp Asp Tyr
 20 25 30
 Ala Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ser Gly Ile Ser Trp Asn Ser Gly Arg Ile Gly Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Glu Asn Ser Leu Phe
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Asn Gly Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Leu Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Lys Gly Arg Asp Ser Phe Asp Ile Trp Gly Gln Gly Thr Met Val
 100 105 110
 Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala
 115 120 125
 Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu
 130 135 140
 Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly
 145 150 155 160
 Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser
 165 170 175
 Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu
 180 185 190
 Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr
 195 200 205
 Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr
 210 215 220
 Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe
 225 230 235 240

Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro
 245 250 255
 Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val
 260 265 270
 Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr
 275 280 285
 Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val
 290 295 300
 Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys
 305 310 315 320
 Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser
 325 330 335
 Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro
 340 345 350
 Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val
 355 360 365
 Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly
 370 375 380
 Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp
 385 390 395 400
 Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp
 405 410 415
 Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His
 420 425 430
 Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 435 440 445

<210> 78

<211> 214

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Uma sequência de polipéptido sintetizada artificialmente

<400> 78

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

1 5 10 15

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

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

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

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

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

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

Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
115 120 125

Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
130 135 140

Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
145 150 155 160

Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
165 170 175

Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
180 185 190

Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
195 200 205

Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210

<210> 79

<211> 267

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 79

Ala	Glu	Ser	His	Leu	Ser	Leu	Leu	Tyr	His	Leu	Thr	Ala	Val	Ser	Ser
1				5					10					15	

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

<210> 80

<211> 99

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 80

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

<210> 81

<211> 16

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Uma sequência de polipéptido sintetizada artificialmente

<400> 81

```
Tyr Ile Ser Tyr Ser Gly Ile Thr Thr Tyr Asn Pro Ser Leu Lys Ser
1          5          10          15
```

<210> 82

<211> 16

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Uma sequência de polipéptido sintetizada artificialmente

<400> 82

Phe	Ile	Ser	Tyr	Ser	Gly	Ile	Thr	Thr	Tyr	Asn	Pro	Ser	Leu	Lys	Ser
1				5					10					15	

<210> 83

<211> 16

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Uma sequência de polipéptido sintetizada artificialmente

<400> 83

Tyr	Ile	Ser	Tyr	Ser	Gly	Ile	Thr	Asn	Tyr	Asn	Pro	Ser	Leu	Lys	Ser
1				5					10					15	

<210> 84

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Uma sequência de polipéptido sintetizada artificialmente

<400> 84

Ser	Leu	Ala	Arg	Thr	Thr	Ala	Met	Asp	Tyr
1				5					10

<210> 85
<211> 10
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Uma sequência de polipeptido sintetizada artificialmente

<400> 85

Leu	Leu	Ala	Arg	Thr	Thr	Ala	Met	Asp	Tyr
1				5					10

<210> 86
<211> 10
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Uma sequência de polipeptido sintetizada artificialmente

<400> 86

Ser	Leu	Ala	Arg	Ala	Thr	Ala	Met	Asp	Tyr
1				5					10

<210> 87
<211> 11
<212> PRT
<213> Artificial

<220>

<223> Uma sequência de polipéptido sintetizada artificialmente

<400> 87

Arg Ala Ser Gln Asp Ile Ser Ser Tyr Leu Asn

1 5 10

<210> 88

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Uma sequência de polipéptido sintetizada artificialmente

<400> 88

Arg Ala Ser Thr Asp Ile Ser Ser Tyr Leu Asn
1 5 10

<210> 89

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Uma sequência de polipéptido sintetizada artificialmente

<400> 89

Arg	Ala	Ser	Arg	Asp	Ile	Ser	Ser	Tyr	Leu	Asn
1				5					10	

<210> 90

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Uma sequência de polipéptido sintetizada artificialmente

<400> 90

Gln	Gln	Gly	Asn	Thr	Leu	Pro	Tyr	Thr
1				5				

<210> 91

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Uma sequência de polipéptido sintetizada artificialmente

<400> 91

Gly	Gln	Gly	Asn	Thr	Leu	Pro	Tyr	Thr
1				5				

<210> 92

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Uma sequência de polipéptido sintetizada artificialmente

<400> 92

Gln Gln Gly Asn Arg Leu Pro Tyr Thr
1 5

<210> 93

<211> 30

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Uma sequência de polipéptido sintetizada artificialmente

<400> 93

Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Arg Pro Ser Gln
1 5 10 15
Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Tyr Ser Ile Thr
20 25 30

<210> 94

<211> 30

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Uma sequência de polipéptido sintetizada artificialmente

<400> 94

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

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

<210> 95

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Uma sequência de polipéptido sintetizada artificialmente

<400> 95

Ser Asp His Ala Trp Ser
 1 5

<210> 96

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Uma sequência de polipéptido sintetizada artificialmente

<400> 96

Asp Asp His Ala Trp Ser
 1 5

<210> 97

<211> 14

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Uma sequência de polipéptido sintetizada artificialmente

<400> 97

Trp Val Arg Gln Pro Pro Gly Arg Gly Leu Glu Trp Ile Gly
1 5 10

<210> 98

<211> 14

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Uma sequência de polipéptido sintetizada artificialmente

<400> 98

Trp Val Arg Gln Pro Pro Gly Glu Gly Leu Glu Trp Ile Gly
1 5 10

<210> 99

<211> 16

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Uma sequência de polipéptido sintetizada artificialmente

<400> 99

Tyr	Ile	Ser	Tyr	Ser	Gly	Ile	Thr	Thr	Tyr	Asn	Pro	Ser	Leu	Gln	Asp
1				5					10					15	

<210> 100

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Uma sequência de polipéptido sintetizada artificialmente

<400> 100

Trp	Gly	Gln	Gly	Ser	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser
1				5					10	

<210> 101

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Uma sequência de polipéptido sintetizada artificialmente

<400> 101

Trp	Gly	Glu	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser
1				5					10	

<210> 102

<211> 23

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Uma sequência de polipeptido sintetizada artificialmente

<400> 102

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys
20

<210> 103

<211> 23

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Uma sequência de polipeptido sintetizada artificialmente

<400> 103

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

Asp Ser Val Thr Ile Thr Cys
20

<210> 104

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Uma sequência de polipéptido sintetizada artificialmente

<400> 104

Gln	Ala	Ser	Gln	Asp	Ile	Ser	Ser	Tyr	Leu	Asn
1				5					10	

<210> 105

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Uma sequência de polipéptido sintetizada artificialmente

<400> 105

Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Pro	Gly	Lys	Ala	Pro	Lys	Leu	Leu	Ile	Tyr
1				5				10					15	

<210> 106

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Uma sequência de polipéptido sintetizada artificialmente

<400> 106

Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Pro	Gly	Lys	Ala	Pro	Glu	Leu	Leu	Ile	Tyr
1				5					10					15

<210> 107

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Uma sequência de polipéptido sintetizada artificialmente

<400> 107

Tyr	Thr	Ser	Arg	Leu	His	Ser
1				5		

<210> 108

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Uma sequência de polipéptido sintetizada artificialmente

<400> 108

Tyr	Thr	Ser	Glu	Leu	Glu	Ser
1				5		

<210> 109

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Uma sequência de polipéptido sintetizada artificialmente

<400> 109

Tyr Thr Ser Arg Leu Leu Ser
1 5

<210> 110

<211> 32

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Uma sequência de polipéptido sintetizada artificialmente

<400> 110

Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr
1 5 10 15

Phe Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys
20 25 30

<210> 111

<211> 32

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Uma sequência de polipéptido sintetizada artificialmente

<400> 111

Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr
 1 5 10 15

Phe Thr Ile Ser Ser Leu Glu Ala Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys
 20 25 30

<210> 112

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Uma sequência de polipéptido sintetizada artificialmente

<400> 112

Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 1 5 10

<210> 113

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Uma sequência de polipéptido sintetizada artificialmente

<400> 113

Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Glu
 1 5 10

<210> 114

<211> 30

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Uma sequência de polipéptido sintetizada artificialmente

<400> 114

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

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

<210> 115

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Uma sequência de polipéptido sintetizada artificialmente

<400> 115

His	Asp	His	Ala	Trp	Ser
1				5	

<210> 116

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Uma sequência de polipéptido sintetizada artificialmente

<400> 116

Arg	Ala	Ser	Gln	Asp	Ile	Ser	Ser	His	Leu	Asn
1				5					10	

<210> 117

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Uma sequência de polipéptido sintetizada artificialmente

<400> 117

Tyr	Thr	Ser	His	Leu	His	Ser
1				5		

Lisboa, 10 de Agosto de 2015.

REIVINDICAÇÕES

1. Anticorpo anti-recetor de IL-6 caracterizado pelo facto de ser qualquer um de:

(a) um anticorpo que contém uma região variável de cadeia pesada que compreende a sequência da SEQ ID NO: 20 (região variável de VP3-M73) e uma região variável de cadeia leve que compreende a sequência da SEQ ID NO: 23 (região variável de VL3);

(b) um anticorpo que contém uma região variável de cadeia pesada que compreende a sequência da SEQ ID NO: 19 (região variável de VP4-M73) e uma região variável de cadeia leve que compreende a sequência da SEQ ID NO: 22 (região variável de VL1); e

(c) um anticorpo que contém uma região variável de cadeia pesada que compreende a sequência da SEQ ID NO: 21 (região variável de VP5-M83) e uma região variável de cadeia leve que compreende a sequência da SEQ ID NO: 24 (região variável de VL5).

2. Anticorpo anti-recetor de IL-6 caracterizado pelo facto de ser qualquer um de:

(a) um anticorpo que contém uma cadeia pesada que compreende a sequência da SEQ ID NO: 26 (VP3-M73) e uma cadeia leve que compreende a sequência da SEQ ID NO: 29 (VL3);

(b) um anticorpo que contém uma cadeia pesada que compreende a sequência da SEQ ID NO: 25 (VP4-M73) e uma cadeia leve que compreende a sequência da SEQ ID NO: 28 (VL1); e

(c) um anticorpo que contém uma cadeia pesada que compreende a sequência da SEQ ID NO: 27 (VP5-M83) e

uma cadeia leve que compreende a sequência da SEQ ID NO: 30 (VL5).

3. Gene caracterizado pelo facto de codificar o anticorpo de acordo com a reivindicação 1 ou 2.
4. Vetor caracterizado pelo facto de comportar o gene de acordo com a reivindicação 3.
5. Célula hospedeira caracterizado pelo facto de comportar o vetor de acordo com a reivindicação 4.
6. Processo para a produção do anticorpo de acordo com a reivindicação 1 ou 2 caracterizado pelo facto de se fazer uma cultura da célula hospedeira de acordo com a reivindicação 5.
7. Composição farmacêutica caracterizada pelo facto de conter o anticorpo de acordo com a reivindicação 1 ou 2 ou um anticorpo produzido pelo processo de acordo com a reivindicação 6.

Lisboa, 10 de Agosto de 2015.

RESUMO

MOLÉCULA DE ANTICORPO MELHORADA CONTRA RECETORES DE IL-6

A presente invenção tem por objeto composições farmacêuticas que contêm moléculas de segunda geração que são superiores a TOCILIZUMABE, por meio da alteração das sequências de aminoácidos das regiões variável e constante de TOCILIZUMABE, que é um anticorpo humanizado, IgG 1, anti-recetor de IL-6, para aumentar a capacidade de neutralização do antigénio e melhorar a farmacocinética, de tal modo que o efeito terapêutico é exercido com uma menor frequência de administração e com uma melhoria das propriedades de imunogenicidade, segurança e propriedades físico-químicas (estabilidade e homogeneidade). A presente invenção também tem por objeto processos para a produção destas composições farmacêuticas.

Os requerentes geraram com sucesso moléculas de segunda geração que são superiores a TOCILIZUMABE, por combinação apropriada de alterações das sequências de aminoácidos nos domínios de RDC, nas regiões variáveis e nas regiões constantes.

CLASSI- FICAÇÃO RDC	SEQUÊNCIA RDC TOCILIZUMABE	SÍTIO DE MUTACÃO (Kabat No.)	AMINOÁCIDOS DE TOCILIZUMAB	AMINOÁCIDOS APÓS MUTACÃO	SEQUÊNCIA DE RDC APÓS MUTACÃO
HCDR2	YISYSGITTYNPSLKS	50	Y	F	FISYSGITTYNPSLKS (SEQ ID NO: 82)
HCDR2	YISYSGITTYNPSLKS (SEQ ID NO: 81)	58	T	N	YISYSGITNYPNPSLKS (SEQ ID NO: 83)
HCDR3	SLARTTAMDY	95	S	L	LLARTTAMDY (SEQ ID NO: 85)
HCDR3	SLARTTAMDY (SEQ ID NO: 84)	99	T	A	SLARATAMDY (SEQ ID NO: 86)
LCDR1	RASQDISSYLN	27	Q	T	RASTDISSYLN (SEQ ID NO: 88)
LCDR1	RASQDISSYLN (SEQ ID NO: 87)	27	Q	R	RASRDISSYLN (SEQ ID NO: 89)
LCDR3	QQGNTLPYT	89	Q	G	QQGNTLPYT (SEQ ID NO: 91)
LCDR3	QQGNTLPYT (SEQ ID NO: 90)	93	T	R	QQGNRLPYT (SEQ ID NO: 92)

FIG. 1

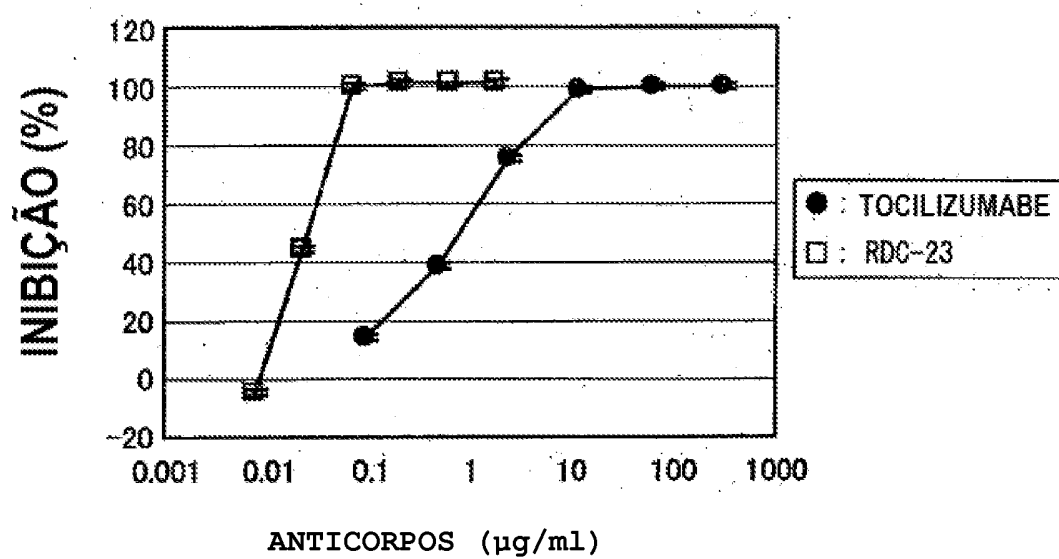


FIG. 2

CLASSIFI- CAÇÃO	SEQUÊNCIA TOCILIZUMABE	SÍTIO DE MUTAÇÃO (Kabat No.)	AMINO ÁCIDO DE TOCILIZUMABE	AMINOÁCIDO APÓS MUTAÇÃO	SEQUÊNCIA APÓS MUTAÇÃO
HFR1	QVQLQESGPGLVKPSQTLSTC TVSGYSIT (SEQ ID NO: 93)	13	R	K	QVQLQESGPGLVKPSQTLSTC AVSGYSIS (SEQ ID NO: 94)
		16	Q	E	
		23*	T	A	
HCDR1	SDHAWS (SEQ ID NO: 95)	30*	T	S	DDHAWS (SEQ ID NO: 96)
		31	S	D	
HFR2	WVRQPPGEGLEWIG (SEQ ID NO: 97)	43	R	E	WVRQPPGEGLEWIG (SEQ ID NO: 98)
HCDR2	YISYSGITTYNPSLKS (SEQ ID NO: 81)	64	K	Q	YISYSGITTYNPSLQD (SEQ ID NO: 99)
		65	S	D	
HFR4	WGQGS�TVSS (SEQ ID NO: 100)	105 107*	Q S	E T	WGEGTLTVSS (SEQ ID NO: 101)
LFR1	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTTC (SEQ ID NO: 102)	18	R	S	DIQMTQSPSSLSASVGDSVTTC (SEQ ID NO: 103)
LCDR1	RASQDISSYLN (SEQ ID NO: 87)	24	R	Q	QASQDISSYLN (SEQ ID NO: 104)
LFR2	WYQQKPGKAPKLLIY (SEQ ID NO: 105)	45	K	E	WYQQKPGKAPELLIY (SEQ ID NO: 106)
LCDR2	YTSRLHS (SEQ ID NO: 107)	53	R	E	YTSELES (SEQ ID NO: 108)
		55	H	E	
		55	H	L	YTSRLLS (SEQ ID NO: 109)
LFR3	GVPSRFSGSGSGTDFTFTISSLOPE DAITYYC (SEQ ID NO: 110)	80	Q	E	GVPSRFSGSGSGTDFTFTISSLEAE DAITYYC (SEQ ID NO: 111)
		81*	P	A	
		83*	I	A	
LFR4	FGQGTKVEIK (SEQ ID NO: 112)	107	K	E	FGQGTKVEIE (SEQ ID NO: 113)

FIG. 3

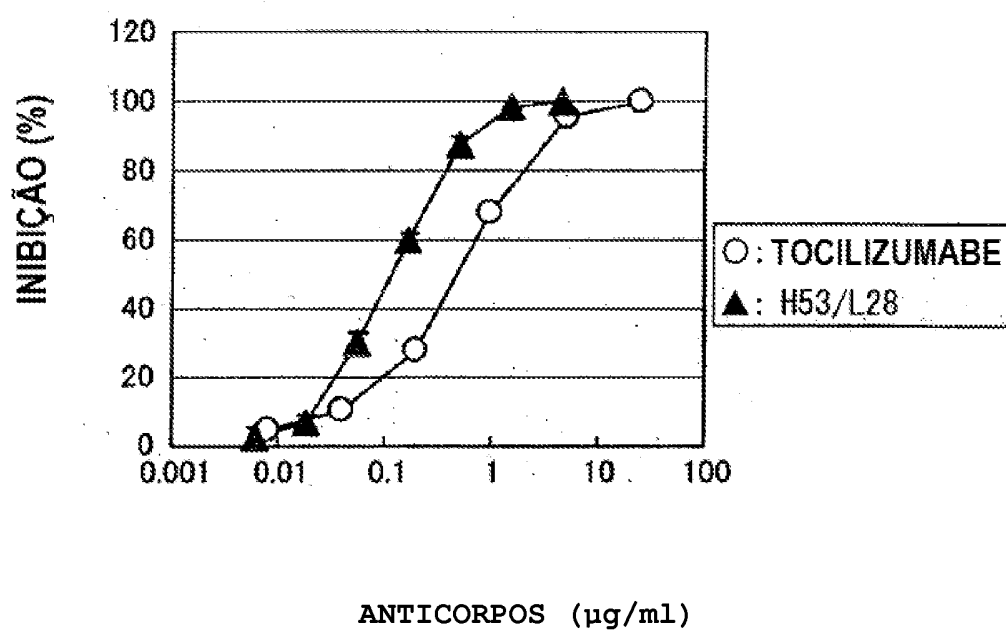


FIG. 4

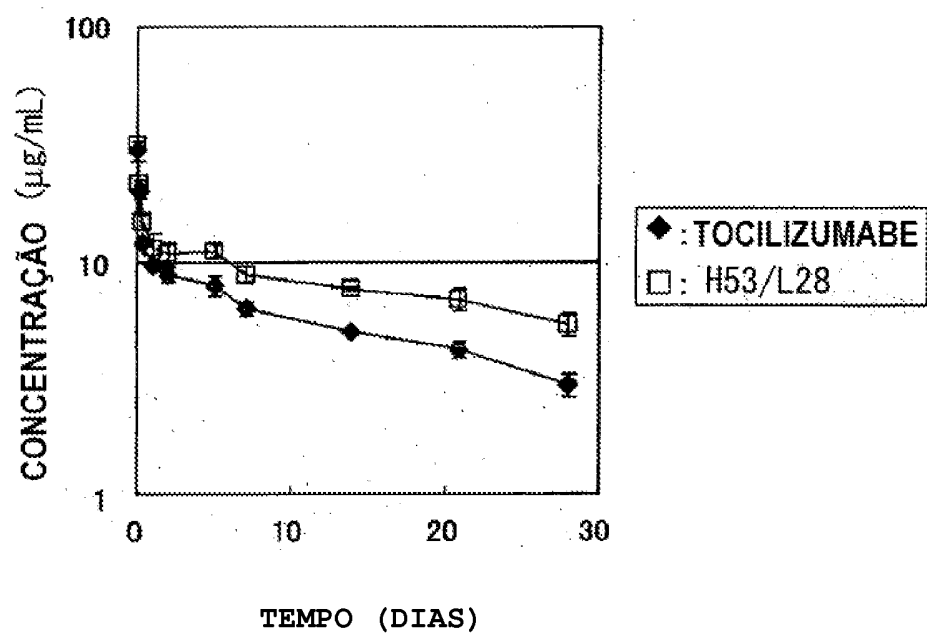


FIG. 5

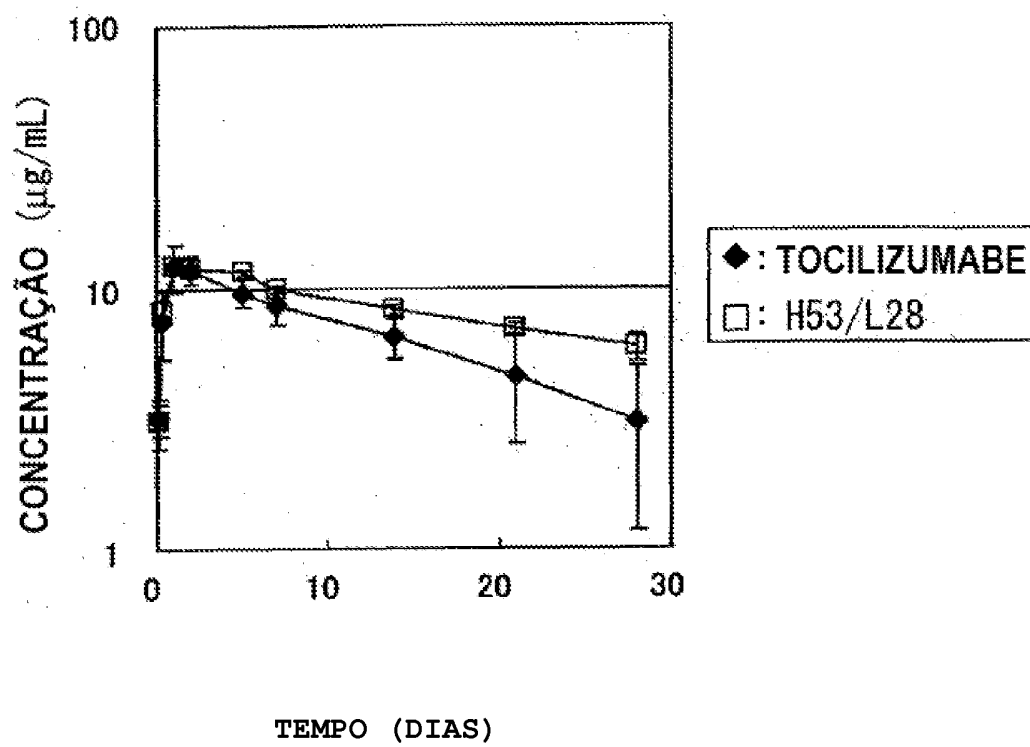


FIG. 6

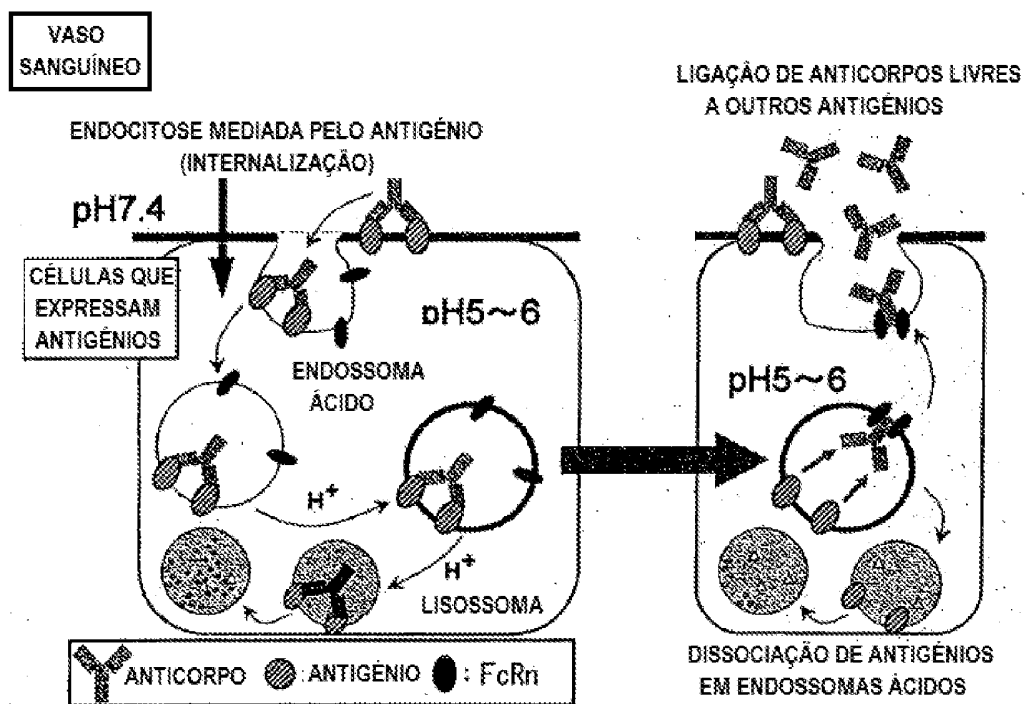


FIG. 7

CLASSIFICAÇÃO	SEQUÊNCIA DE TOCILIZUMAB	SÍTIO DE MUTACÃO (Kabat No.)	AMINO- ÁCIDO DE TOCILIZUMABE	AMINO- ÁCIDO APÓS MUTACÃO	SEQUÊNCIA APÓS MUTACÃO
HFR1	QVQLQESGPGGLVRPSQTL LTCTVSGYSIT (SEQ ID NO: 93)	27	Y	H	QVQLQESGPGGLVRPSQTL LTCTVSGHSIT (SEQ ID NO: 114)
HCDR1	SDHAW (SEQ ID NO: 95)	31	S	H	HDHAW (SEQ ID NO: 115)
LCDR1	RASQDISSYLN (SEQ ID NO: 87)	32	Y	H	RASQDISSHLN (SEQ ID NO: 116)
LCDR2	YTSRLHS (SEQ ID NO: 107)	53	R	H	YTSHLHS (SEQ ID NO: 117)

FIG. 8

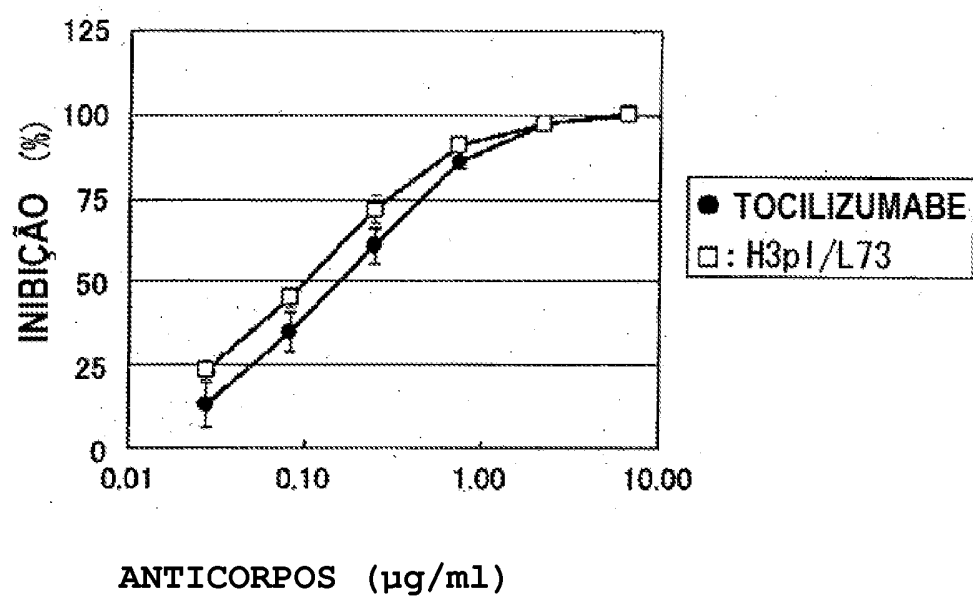


FIG. 9

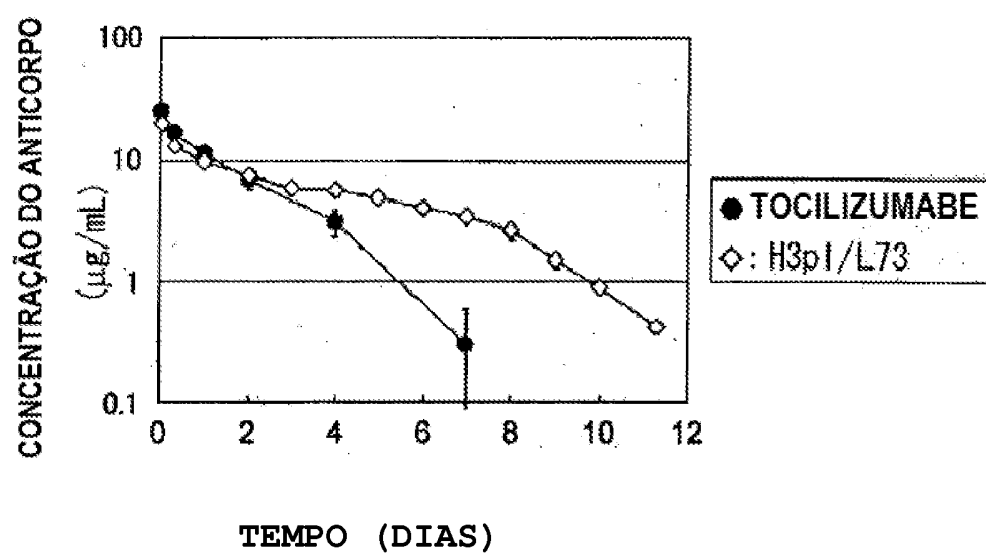


FIG. 10

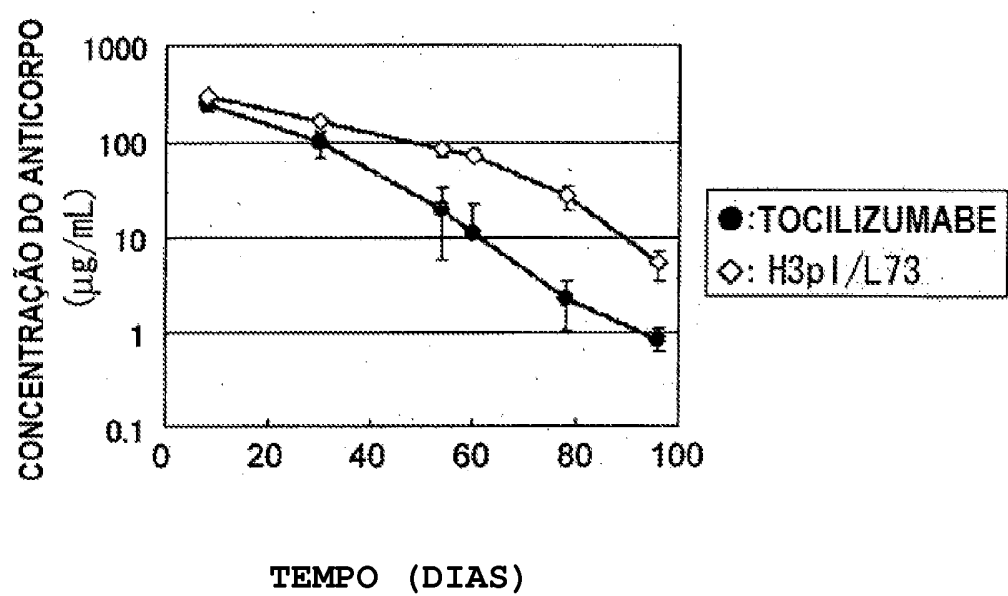


FIG. 11

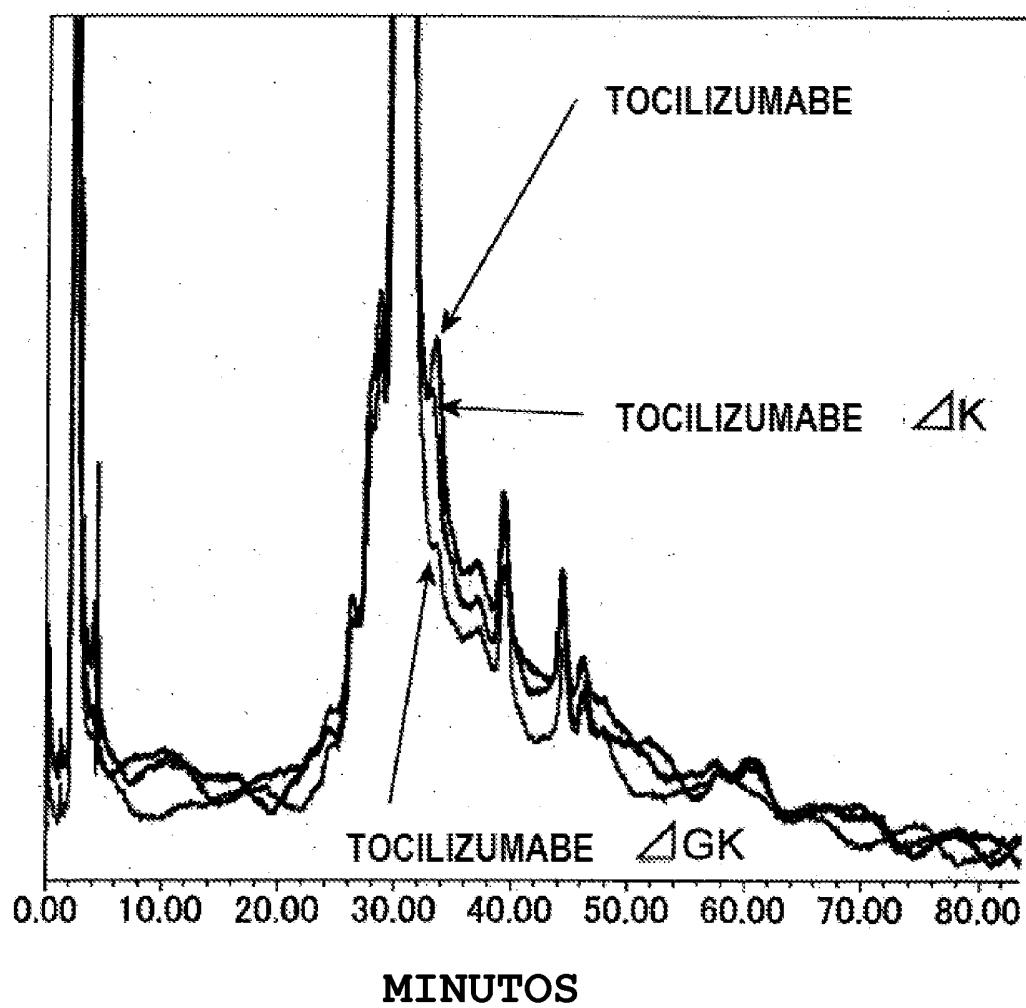


FIG. 12

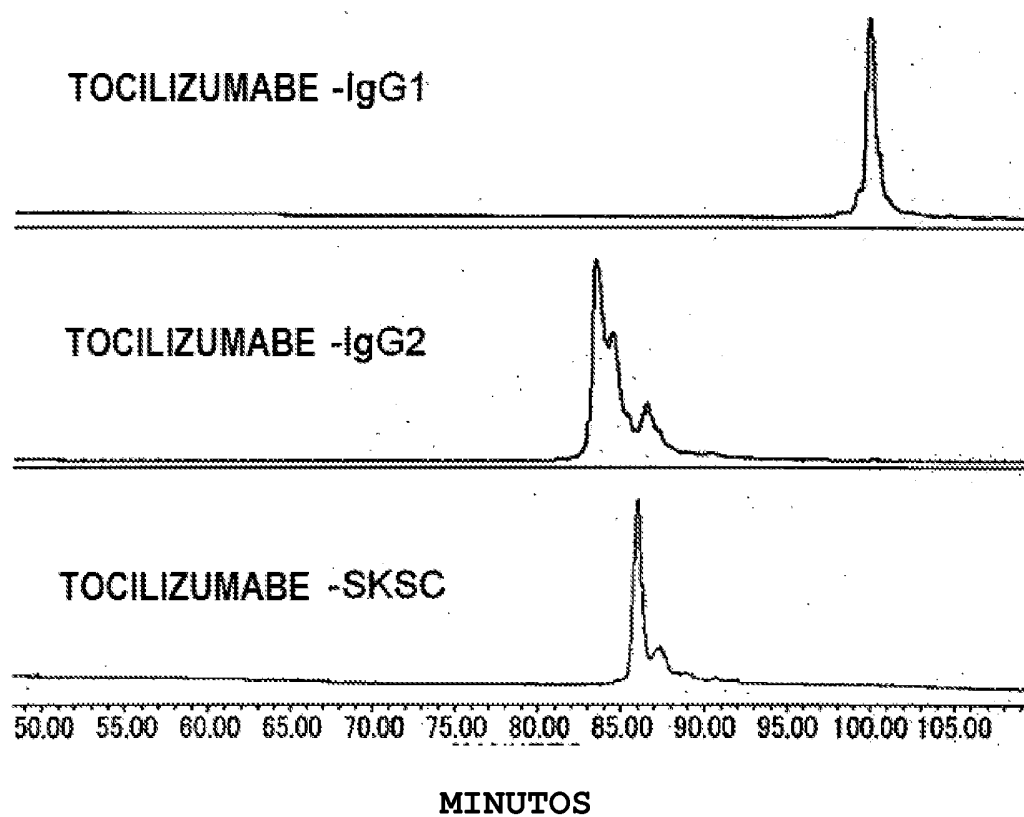


FIG. 13

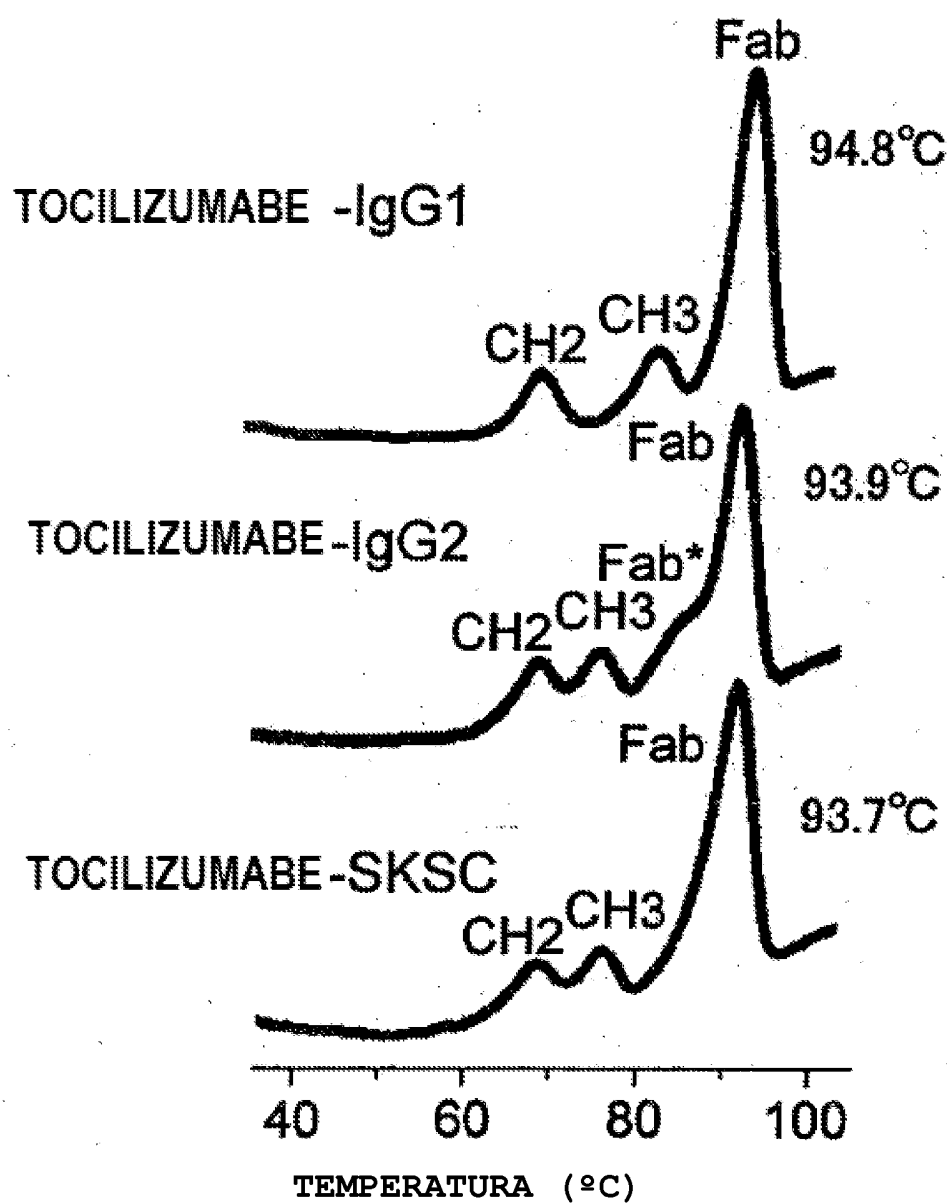


FIG. 14

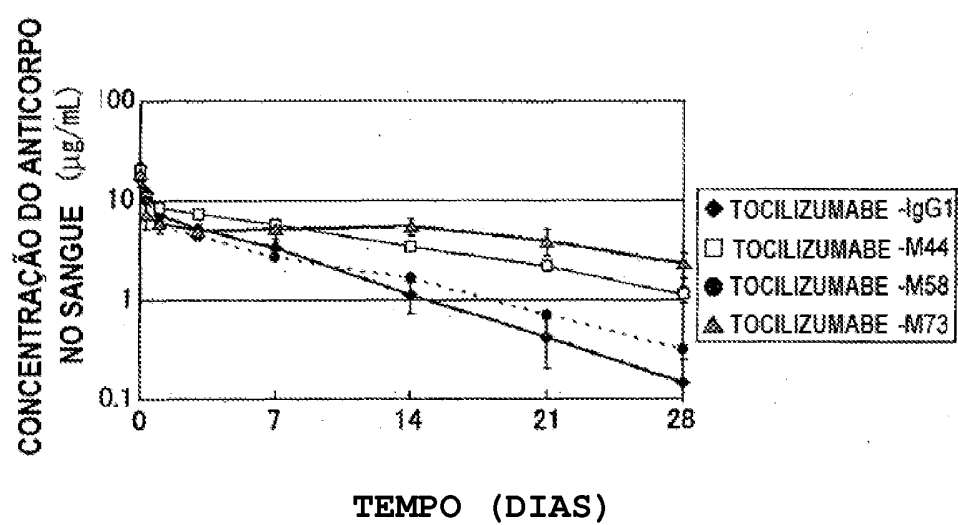


FIG. 15

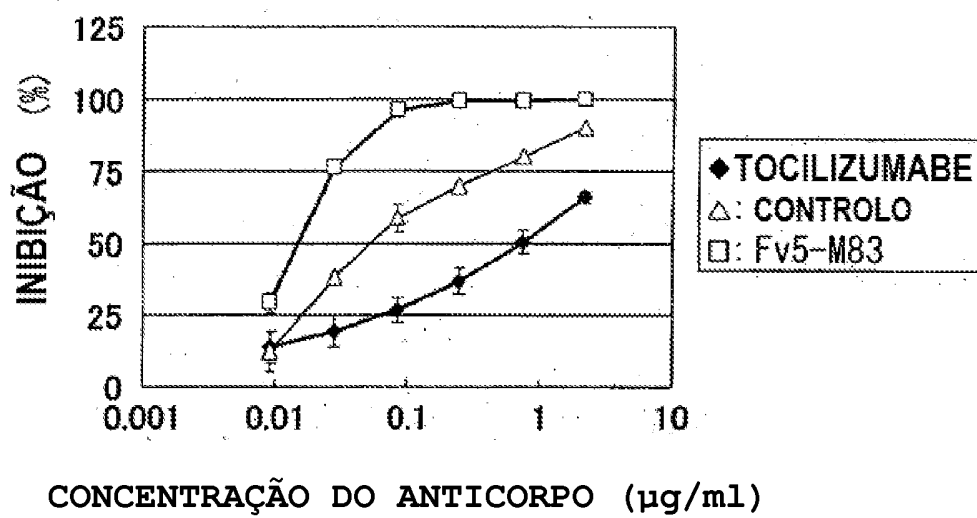


FIG. 16

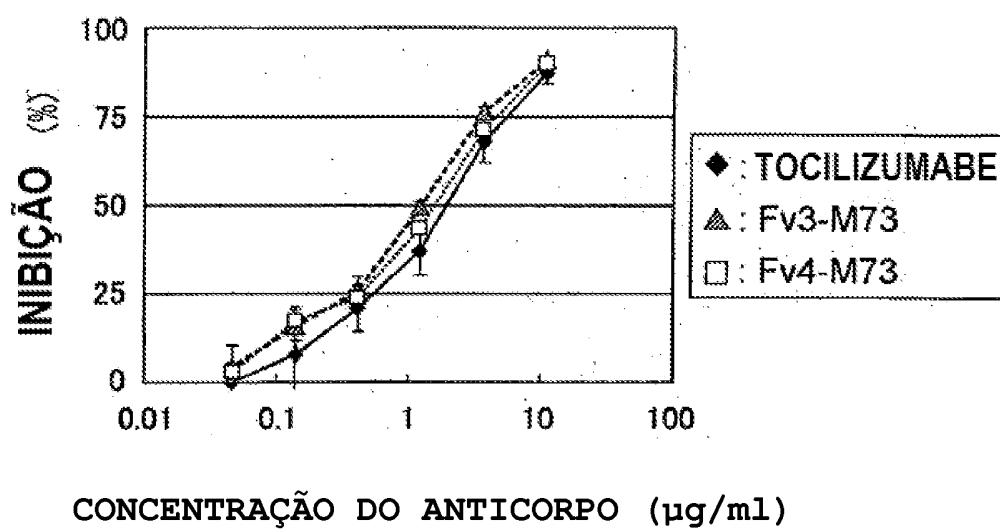


FIG. 17

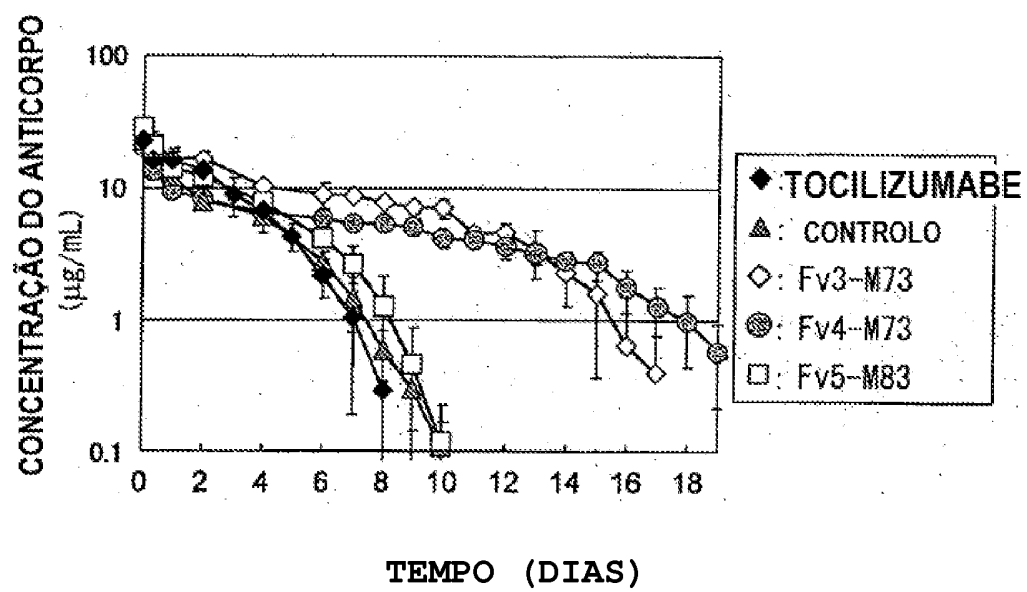


FIG. 18

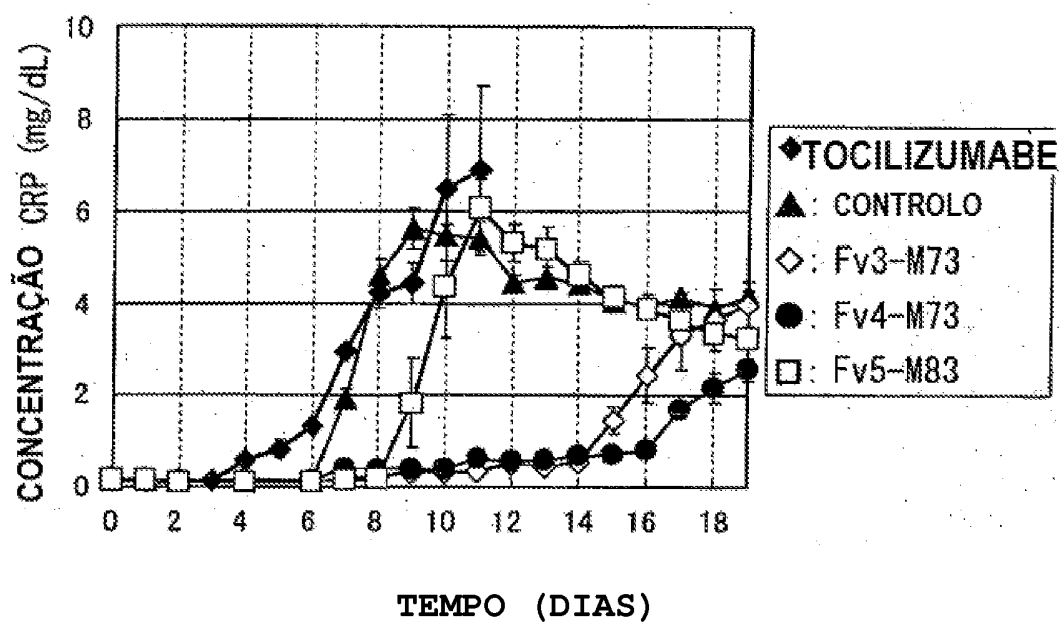


FIG. 19

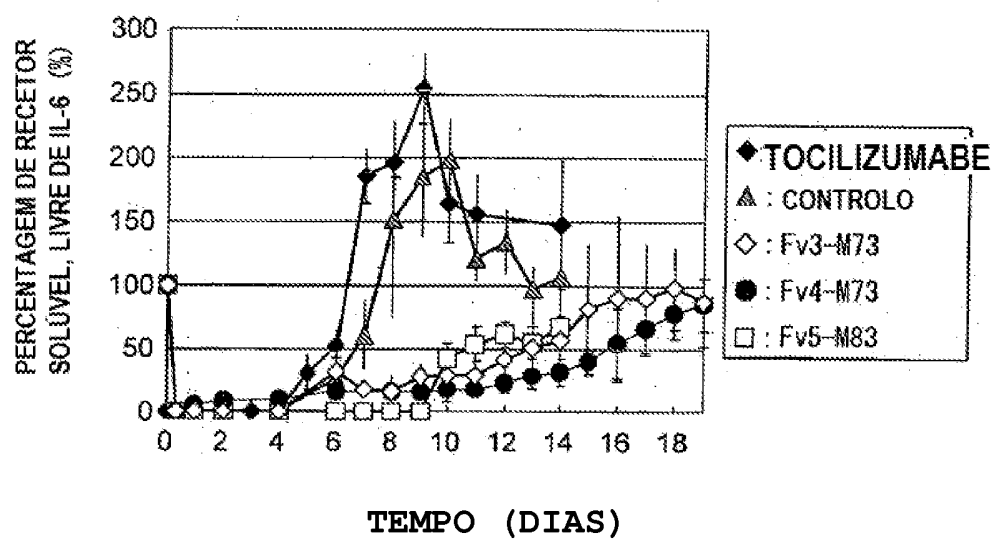


FIG. 20

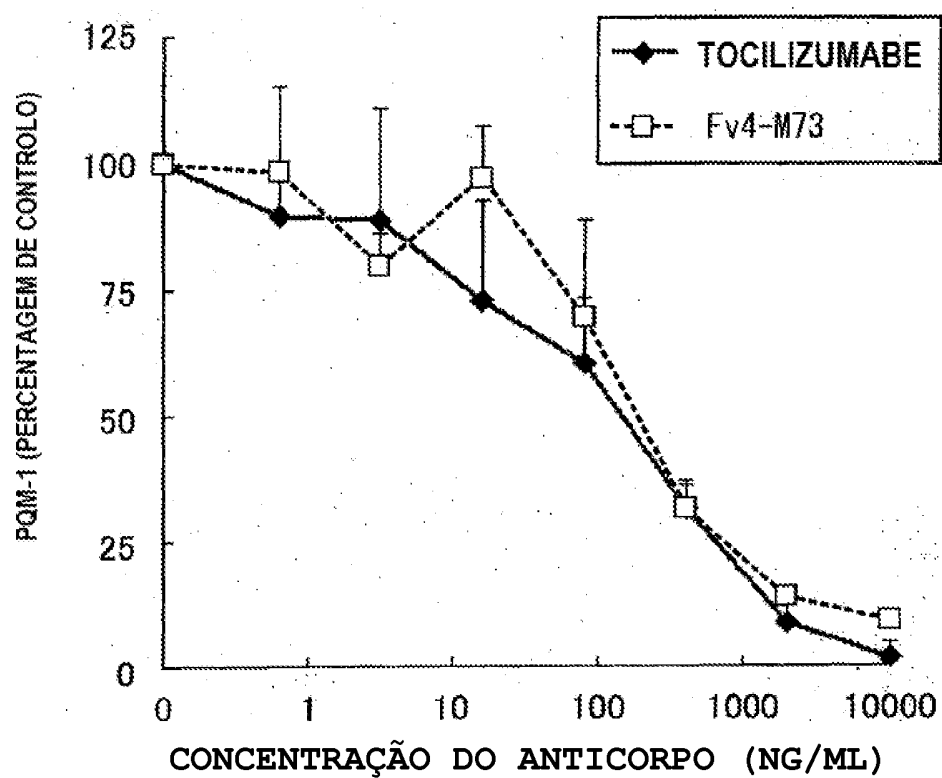


FIG. 21

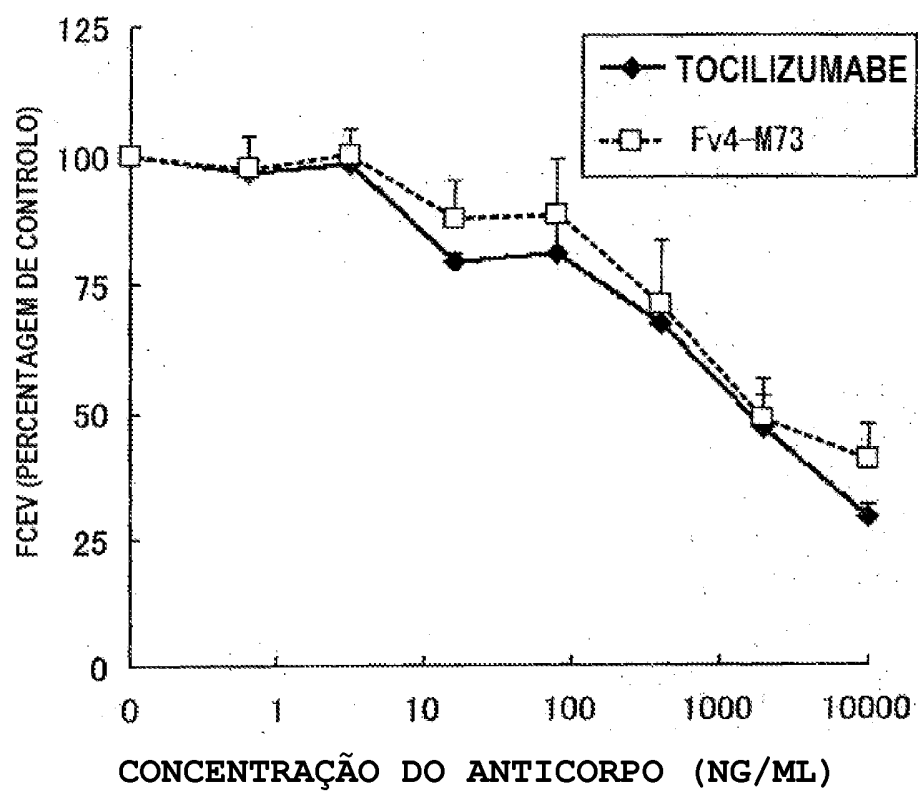


FIG. 22