

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

(22) Data de pedido: 2007.09.14	(73) Titular(es): CREABILIS THERAPEUTICS S.R.L.	
(30) Prioridade(s): 2006.09.15 EP 06019362 2007.03.05 US 904776 P	BIOINDUSTRY PARK, VIA RIBES 5 10010	
(43) Data de publicação do pedido: 2009.06.17	COLLERETTO GIACOSA (TO)	IT
(45) Data e BPI da concessão: 2011.04.13 129/2011	(72) Inventor(es): SILVANO FUMERO	IT
	VALENTINA MAINERO	IT
	SILVIO TRAVERSA	IT
	CHIARA LORENZETTO	IT
	SEBASTIANO MORENA	IT
	(74) Mandatário: ANTÓNIO JOÃO COIMBRA DA CUNHA FERREIRA	
	RUA DAS FLORES, Nº 74, 4º AND 1249-235 LISBOA	PT

(54) Epígrafe: **CONJUGADOS POLIMÉRICOS DE BOX-A DE HMGB1 E VARIANTES DE BOX-A DE HMGB1**

(57) Resumo:

O PRESENTE INVENTO DIZ RESPEITO A NOVOS CONJUGADOS POLIMÉRICOS DE VARIANTES POLIPEPTÍDICAS DO DOMÍNIO DE UNIÃO DE ELEVADA AFINIDADE BOX-A DE HMGB1 (HMGB1 BOX-A) OU DE UM FRAGMENTO BIOLOGICAMENTE ACTIVO DE HMGB1 BOX-A. MAIS, O INVENTO DIZ RESPEITO A NOVOS CONJUGADOS POLIMÉRICOS DE VARIANTES POLIPEPTÍDICAS DO DOMÍNIO DE UNIÃO DE ELEVADA AFINIDADE BOX-A HMGB1 (HMGB1 BOX-A). ALÉM DISSO, O PRESENTE INVENTO DIZ RESPEITO AO USO DOS REFERIDOS DOS REFERIDOS CONJUGADOS POLIMÉRICOS DE MOLÉCULAS POLIPEPTÍDICAS DE HMGB1 BOX-A PARA DIAGNOSTICAR, PREVENIR, ALIVIAR E/OU TRATAR PATOLOGIAS ASSOCIADAS COM HMGB1 EXTRA-CELULAR E/OU ASSOCIADAS COM UM INCREMENTO DA EXPRESSÃO DO RAGE.

RESUMO

"Conjugados poliméricos de Box-A de HMGB1 e variantes de Box-A de HMGB1"

O presente invento diz respeito a novos conjugados poliméricos de variantes polipeptídicas do domínio de união de elevada afinidade Box-A de HMGB1 (HMGB1 Box-A) ou de um fragmento biologicamente activo de HMGB1 Box-A. Mais, o invento diz respeito a novos conjugados poliméricos de variantes polipeptídicas do domínio de união de elevada afinidade Box-A HMGB1 (HMGB1 Box-A). Além disso, o presente invento diz respeito ao uso dos referidos dos referidos conjugados poliméricos de moléculas polipeptídicas de HMGB1 Box-A para diagnosticar, prevenir, aliviar e/ou tratar patologias associadas com HMGB1 extra-celular e/ou associadas com um incremento da expressão do RAGE.

DESCRIÇÃO

"Conjugados poliméricos de Box-A de HMGB1 e variantes de Box-A de HMGB1"

O presente invento diz respeito a novos conjugados poliméricos do domínio de união de elevada afinidade Box-A de HMGB1 (HMGB1 Box-A) ou de um fragmento biologicamente activo de HMGB1 Box-A. Mais, o invento diz respeito a novos conjugados poliméricos de variantes polipeptídicas do domínio de união de elevada afinidade Box-A HMGB1 (HMGB1 Box-A) ou dos fragmentos biologicamente activos do HMGB1 Box-A. Além disso, o presente invento diz respeito ao uso dos referidos conjugados poliméricos para diagnosticar, prevenir, aliviar e/ou tratar patologias associadas com HMGB1 extra-celular e/ou associadas com um incremento da expressão do RAGE.

A proteína HMGB1 pertence à família de proteínas do grupo de elevada mobilidade (HMG). As proteínas HMG, assim denominadas devido à sua elevada mobilidade electroforética em géis de poliacrilamida, são as proteínas não-histónicas mais ubíquas associadas com a cromatina isolada em células eucarióticas. Estas proteínas desempenham um papel "arquitectónico" generalizado na dobragem, espiralamento, desdobramento e enrolamento, uma vez que as mesmas distorcem, dobram ou modificam as estruturas de ADN e complexos com factores de transcrição ou histonas (Andersson et al., 2002; Agresti et al., Degryse et al., 2003). A proteína do grupo de elevada mobilidade 1 (HMGB1) é normalmente um factor nuclear, em particular uma molécula reguladora transcripcional que causam a dobragem do ADN e facilitam a união de vários complexos transcripcionais.

Estruturalmente, a proteína HMGB1 é uma proteína de aproximadamente 25 kDa com uma sequência muito preservada entre os mamíferos, em que 2 de 214 aminoácidos têm substituições conservadoras em todas as espécies de mamíferos. A HMGB1 está omnipresente em todos os núcleos de vertebrados e em particular pode encontrar-se nos fibroblastos, neurónios, hepatócitos, glia e em células derivadas de células estaminais hematopoiéticas, incluindo monócitos/macrófagos, neutrófilos e plaquetas. A molécula de

HMGB1 possui uma estrutura tripartida composta por três domínios distintos: dois domínios de união de ADN denominados como HMG Box-A e Box-B, e um ácido carboxílico terminal, tornando-a bipolarmente carregada.

As duas caixas de HMGB1 estão envolvidas na função da proteína como elementos de união arquitectural de ADN específicos não sequenciais, conferindo a capacidade de unir ADN a estruturas distorcidas de ADN reconhecidas e estabilizar a montagem, remodelação e deslizamento de nucleossomas. Tanto a Box-A como a B de HMG são constituídas por 84 resíduos de aminoácidos altamente conservados, estão fortemente carregadas positivamente e estão dispostas em três α -hélices possuindo uma dobragem similar em forma de L. O braço longo do "L" contém o filamento prolongado com N-terminal e a hélice III (Andersson et al. 2002; Agresti et al., 2003; Thomas, J.O. 2001), enquanto o braço curto compreende as hélices I e II. A análise estrutura-função revela que o domínio citocina pro-inflamatória da HMGB1 é a B-Box e em particular a sequência dos seus 20 primeiros aminoácidos. A A-Box é um agonista extremamente fraco da libertação da citocina pro-inflamatória activada pela HMGB1 e inibe competitivamente as actividades pro-inflamatórias da B-Box e de toda a proteína. Deste modo, de um ponto de vista farmacológico, a A-Box actua como antagonista dos estados patológicos induzidos e/ou mantidos pela B-Box e HMGB1.

O terceiro domínio, o terminal carboxilo ou extremidade acídica, possui carga extremamente negativa uma vez que contém 30 resíduos ácido aspártico e glutâmico repetitivos, e está ligado às caixas por uma região básica de cerca de 20 resíduos. A HMGB1 do rato e da ratazana diferem da forma humana somente por duas substituições que se encontram localizadas nesta extensão C-terminal contínua.

Além da sua localização nuclear e papel como regulador do factor de transcrição, a HMGB1 também foi encontrada no meio extracelular, libertada activamente por células activadas dos sistemas imunológicos (monócitos e macrófagos) ou libertada passivamente por células danificadas ou necróticas (Andersson et al., 2002; Scaffido et al., 2002;

Bonaldi et al., 2002; Taniguchi et al., 2003; Friedman et al., 2003; Palumbo et al., 2004).

A HMGB1 libertada extracelularmente actua como uma potente citocina e como um factor estimulante de macrófagos extremamente potente. A HMGB1 actua directamente unindo-se à membrana celular, induzindo a sinalização e quimiotaxia, possuindo uma função similar à da quimiocina (Yang et al., 2001) e actuando ainda indirectamente por sobrerregulação da expressão e secreção de citocinas pró-inflamatórias.

Isto torna a proteína HMGB1 extra-celular numa proteína quimiotáctica e quimio reguladora potente que promove uma eficaz resposta imune inflamatória. Além disso, outras proteínas pertencentes à família das proteínas HMG, que são capazes de dobrar o ADN, e libertadas em conjunto com HMGB1 no meio extracelular. Estas proteínas são inter alia HMGB2, HMGB3, HMG-1L10, HMG-4L e SP100-HMG. Estas partilham com a HMGB1 sequências de aminoácidos altamente homólogas. Tal como a HMGB1, desencadeiam/mantêm patologias inflamatórias interagindo com os mesmos receptores, conduzindo aos mesmos caminhos a jusante de interacção.

Em células saudáveis, a HMGB1 migra para o citoplasma quer através de transporte passivo quer de activo. Contudo, todas as células em cultura e monócitos em repouso contêm a larga maioria de HMGB1 no núcleo, indicando que nas condições basais importar é muito mais eficaz que exportar. As células podem transportar HMGB1 a partir do núcleo acetilando resíduos de lisina que são abundantes na HMGB1, neutralizando assim a sua carga básica e tornando-os incapazes de funcionar como sinais de localização nuclear. A hiperacetilação de HMGB1 nuclear determina a realocização desta proteína do núcleo para o citoplasma (por exemplo, nos fibroblastos) ou a sua acumulação nos endolisossomas secretores (por exemplo, em monócitos e macrófagos activados) e subsequente redireccionamento através de uma via secretora não clássica mediada pela vesícula. A secreção da HMGB1 pelos monócitos já activados é então desencadeada pela lisofosfatidilcolina bioactiva (LPC), que é gerada mais tarde no local de inflamação a partir da fosfatidilcolina através da acção da fosfolipase secretora sPLA2 produzida pelos monócitos várias

horas após activação. Deste modo a secreção de HMGB1 parece ser induzida por dois sinais (Bonaldi et al., 2003) e ocorrer em três passos: 1) em primeiro lugar, um sinal inflamatório promove a acetilação da HMGB1 e a sua realocização do núcleo para o citoplasma (passo 1) e armazenagem em vesículas secretoras citoplasmáticas (passo 2); posteriormente, um sinal de secreção (ATP extra-celular ou lisofosfatidilcolina) promove a exocitose (terceiro passo) (Andersson et al., 2002; Scaffidi et al., 2002; Gardella et al., 2002; Bonaldi et al., 2003; Friedman et al., 2003).

A HMGB1 libertada tem sido identificada como um dos ligandos que se liga ao receptor RAGE. Este receptor é expresso na maioria dos tipos de células, e em nível elevado principalmente em células endoteliais, em células de músculo liso vascular, em monócitos e macrófagos e em fagócitos mononucleares. O reconhecimento envolve o C terminal da HMGB1. A interacção da HMGB1 e RAGE despoleta um período sustentado de activação celular mediada pelo excesso de regulação do RAGE e sinalização dependente do receptor. Em particular, a interacção da HMGB1 e RAGE activa várias vias de transdução de sinal intracelular, incluindo cinases de proteínas activadas por mitógenos (MAPKs), Cdc-42, p21ras. Rac e o factor de translocação nuclear κB (NF- κB), o factor de transcrição classicamente ligado aos processos inflamatórios (Shmidt et al., 2001).

De acordo com várias evidências experimentais, a HMGB1 libertada pode também interagir com receptores que pertencem a uma ou mais sub-classe(s) da família dos receptores tipo Toll. Além disso, a HMGB1 pode igualmente interagir com o domínio N-terminal tipo lecitina (D1) da trombomodulina. Devido à capacidade do domínio D1 funcional da trombomodulina de interceptar e ligar-se à HMGB1 circulante, é evitada a interacção com os receptores RAGE e os receptores tipo Toll.

Quando libertada *in vivo*, a HMGB1 é um potente factor estimulante de macrófagos. De facto, tal como outros mediadores de citocina da endotoxemia, a HMGB1 activa *in vitro* uma cascata de múltiplas citocinas pro-inflamatórias (TNF, IL-1 α , IL-1 β , IL-1Ra, IL-6, IL-6, IL-8, MIP-1 α e MIP-1 β) de macrófagos humanos. Desse modo, a HMGB1 actua como um

mediador tardio durante a inflamação aguda e participa de um forma importante na patogénese da inflamação sistémica após a primeira resposta mediadora ter sido resolvida.

Além disso, a sobre-regulação do RAGE observada em ambientes pró-inflamatórios e o comprovado aumento de expressão deste receptor numa variedade de doenças inflamatórias agudas e crónicas proporcionam suporte para o RAGE como um alvo atractivo para futuras intervenções médicas relacionadas com a inflamação.

Os efeitos pró-inflamatórios observados da HMGB1 *in vitro* e a correlação entre os níveis de HMGB1 circulante e o desenvolvimento da sequência patogénica da inflamação sistémica *in vivo* indicam que o direccionamento terapêutico desta molécula tipo citocina deverá possuir relevante valor clínico, sugerindo novas abordagens terapêuticas através de uma administração "tardia" de antagonistas/inibidores (selectivos) das actividades extra-celulares da HMGB1.

Deste modo foram levadas a cabo várias tentativas de modo a bloquear esta proteína quimocitocina HMGB1 extra-celular. Várias abordagens importantes foram dirigidas à administração de anticorpos contra a HMGB1, de anticorpos contra fragmentos de HMGB1 (por exemplo Boxes de HMGB1) de anticorpos para RAGE, de RAGE solúvel (sRAGE), de piruvato de etilo (Czura et al., 2003; Lotze et al., 2003) e domínio N-terminal tipo lecitina (D1) de trombomodulina.

A HMGB1 A-Box, um dos domínios de união a ADN na HMGB1, tem sido identificada como um antagonista específico da HMGB1: A-Box recombinante altamente purificada tem protegido ratos em relação à sépsia experimental letal mesmo quando o tratamento inicial foi atrasado em 24 horas após a indução da patologia, sugerindo ainda que os antagonistas da HMGB1 podem ser administrados com sucesso numa janela clinicamente relevante mais ampla do que a usada para outras citocinas conhecidas (Yang et al., 2004).

A análise de função estrutural de mutantes truncados de HMGB1 revelou que o domínio A-Box de HMGB1 desloca de modo competitivo a ligação saturável de HMGB1 aos macrófagos,

antagonizando especificamente as actividades da HMGB1. Tal como já foi visto com a actividade protectora dos anticorpos anti-HMGB1, a administração da A-Box salva os ratos da sépsia mesmo quando o tratamento foi iniciado tão tarde como 24 horas após a indução cirúrgica de sépsia (Yang H. et al., 2004). Os antagonistas ou inibidores da HMGB1 seleccionados a partir do grupo de anticorpos ou fragmentos de anticorpos que se ligam a uma proteína de HMGB1, sequências antisense de gene HMGB1 e antagonistas do receptor HMGB1 são conhecidos a partir da US 6,468,533, WO 02/074337 e US 2003/0144201.

Uma tentativa promissora para inibir e/ou antagonizar a proteína quimio-citocina HMGB1 extra-celular é deste modo baseado na evidência experimental que os dois domínios de união de elevada afinidade para o ADN, a saber, HMGB1 Box-A e HMGB1 Box-B, que estão presentes na molécula de HMGB1, possuem dois papéis opostos na proteína libertada no espaço extra-celular. A actividade principal da HMGB1 Box-B é a de mediar as actividades pró-inflamatórias atribuídas à proteína HMGB1. Por outro lado, a HMGB1 Box-A actua como um antagonista que compete com a actividade pró-inflamatória da Box-B.

O pedido de patente WO 2006/024547 divulga variantes polipeptídicas de HMGB1 Box-A, ou de fragmentos biologicamente activos de HMGB1 Box-A, que são obtidos através de mutações sistemáticas de aminoácidos individuais da proteína HMGB1 Box-A natural. Deste modo, a WO 2006/024547 proporciona novos agentes como inibidores selectivos e/ou antagonistas de HMGB1 extra-celular e seu uso para prevenir, aliviar e/ou tratar o amplo espectro de estados patológicos associados e induzidos pela quimiocina HMGB1 extra-celular e/ou pela cascata de múltiplas citocinas inflamatórias provocados pela libertação extra-celular das proteínas quimiocina HMGB1.

A eficácia da administração de fármacos de proteínas sintéticas pode ser dificultada in vivo por factores tais como solubilidade ao pH fisiológico, rápida eliminação por filtração glomerular, eliminação celular e metabolismo bem como rápida absorção. A eficácia da administração oral é, por exemplo, dificultada uma vez que as proteínas são digeridas

se tomadas por via oral. Por outro lado a eficácia da administração sistémica é dificultada uma vez que as proteínas abaixo de 65-70 kDa são rapidamente eliminadas do organismo. Em muitos casos, tais efeitos desvantajosos conduzem a uma reduzida aderência dos doentes e a uma reduzida eficácia do fármaco evitando um eficaz uso terapêutico de tais agentes proteicos.

Uma estratégia eficaz de melhorar a eficácia e a duração dos efeitos dos agentes proteicos e para reduzir os potenciais efeitos toxicológicos é a ligação covalente de um agente proteico biologicamente activo a diversos polímeros. Um dos polímeros que é mais frequentemente utilizado na arte para melhorar as propriedades farmacológicas e toxicológicas de um agente activo é o polietilenoglicol, abreviadamente PEG. Os polímeros de polietilenoglicol (PEG) são amfifílicos, não tóxicos e imunologicamente inertes e podem ser conjugados com fármacos para manipular muitas das propriedades farmacocinéticas e toxicológicas.

Na arte, encontram-se reportadas muitas modificações covalentes de proteínas terapeuticamente úteis com polietilenoglicol (PEG). A ligação covalente de PEG a uma proteína ("pegilação") é útil de modo a prolongar a semi-vida de circulação de proteínas, uma vez que aumenta a dimensão efectiva da proteína e reduz a sua taxa de eliminação do corpo. Além disso, a modificação por PEG de uma proteína aumenta a solubilidade e estabilidade da proteína e diminui a imunogenicidade da proteína.

O problema subjacente ao presente invento era pois em conformidade o de proporcionar novos agentes proteicos terapeuticamente úteis, que actuem como antagonistas e/ou inibidores selectivos da HMGB1 extracelular. O âmbito deste invento era pois o de explorar as características peculiares de alguns polímeros, em particular de PEG, de modo a desenvolver novas formas de administração do domínio de união de elevada afinidade Box-A de HMGB1 (HMGB1 Box-A), que apresentem a mesma ou mesmo superior actividade farmacológica e além disso, um desempenho farmacocinético e toxicológico melhorados em comparação com o polipéptido HMGB1 Box-A não conjugado e que permite obter a melhor disponibilidade de

HMGB1 Box-A ou de um fragmento biologicamente activo do mesmo através de várias vias de administração possíveis.

O presente invento é deste modo direccionado para um novo conjugado polimérico do domínio de união de elevada afinidade Box-A de HMGB1 (HMGB1 Box-A) humano e/ou não humano natural ou de um fragmento biologicamente activo de HMGB1 Box-A. A sequência de aminoácidos de HMGB1 Box-A humano é apresentada em SEQ ID NO:1. Uma HMGB1 Box-A não humana preferida é a HMGB1 Box-A de *Anapheles gambia*, cuja sequência é apresentada em SQ ID NO:301.

Um outro aspecto do presente invento está direccionado para um conjugado polimérico de uma variante polipeptídica do domínio de união de elevada afinidade Box-A de HMGB1 (HMGB1 Box-A) humano e/ou não humano ou de um fragmento biologicamente activo de HMGB1 Box-A, no qual a sequência de aminoácidos da referida variante polipeptídica difere da sequência de aminoácidos da HMGB1 do tipo natural pela mutação de um ou mais aminoácidos individuais.

No contexto do presente invento "HMGB1" inclui a forma não acetilada e/ou a forma acetilada da HMGB1. Do mesmo modo "proteínas homólogas a HMGB1" incluem a forma não acetilada e/ou a forma acetilada das proteínas homólogas a HMGB1. As proteínas homólogas a HMGB1 preferidas são HMGB2, HMGB3, HMG-1 L10, HMG-4L e/ou SP100-HMG.

Os novos conjugados poliméricos do presente invento apresentam uma maior solubilidade em água, um manuseamento farmacêutico melhorado, uma farmacocinética e biodisponibilidade melhoradas e/ou uma menor toxicidade e/ou imunogenicidade em comparação com o polipeptídeo ou variante polipeptídica de HMGB1 não conjugados. Mais, foi surpreendentemente determinado que a conjugação do polipeptídeo ou variante polipeptídica e/ou fragmento de HMGB1 Box-A não altera a actividade biológica da proteína.

O fragmento polimérico de acordo com o presente invento tem de ser biocompatível, pode ser de origem natural ou semi-sintética ou sintética e pode possuir uma estrutura linear ou ramificada. Exemplos de polímeros incluem sem limitação

polialquileno glicóis, óxidos de polialquileno, ácido poliacrílico, poliacrilatos, poliacrilamida ou seus derivados N-alquilo, ácido polimetacrílico, polimetacrilatos, ácido polietilacrílico, polietilacrilatos, polivinilpirrolidina, poli(álcool vinílico), ácido poliglicólico, ácido poliláctico, ácido poli(láctico-co-glicólico), dextrano, quitosana, poliaminoácidos.

Numa concretização muito preferida do presente invento, o polímero é polietileno glicol (PEG) ou polietileno glicol em que o grupo OH terminal pode opcionalmente estar modificado, por exemplo, com grupos alquilo C₁-C₅ ou grupo acilo C₁-C₅, preferencialmente com grupos alquilo C₁-, C₂- ou C₃ ou grupos acilo C₁-, C₂- ou C₃. Preferencialmente, o polietileno glicol modificado é metoxi-polietileno-glicol (mPEG).

O polímero usado de acordo com o presente invento possui um peso molecular que varia de 100 a 100.000 Da, preferencialmente de 5.000 a 50.000 Da. Numa concretização muito preferida do invento, o polímero é PEG, o qual preferencialmente possui um grupo OH e/ou metoxi terminal, com um peso molecular que varia de 10.000 a 40.000 Da, e preferencialmente de 20.000 Da a 40.000 Da. Na concretização mais preferida, é utilizado no presente invento um PEG, que possui preferencialmente um grupo OH e/ou metoxi terminal, com um peso molecular médio de 20.000 Da ou de 40.000 Da.

O fragmento polímero do conjugado polimérico do invento é conjugado com o polipéptido ou variante polipéptídica de HMGB1 através de uma ligação química covalente de modo a proporcionar um conjugado estável.

Os pontos preferenciais de conjugação no fragmento HMGB1 Box-A são seleccionados a partir do resíduo lisina, cisteína, histidina, arginina, tirosina, serina, treonina, aspartato e glutamato ou a partir do grupo amino N-terminal do fragmento proteína.

Os conjugados poliméricos do presente invento podem ser conjugados mono-, di- e multi-pegilados. Preferencialmente, os conjugados poliméricos do invento são mono-pegilados.

O fragmento polímero encontra-se usualmente ligado de modo covalente ao fragmento HMGB1 Box-A através de um grupo ligante. Em particular, no contexto do presente invento o termo grupo ligante significa um grupo que é obtido através da reacção química entre o fragmento polipéptido e o fragmento polímero. O grupo ligante pode ser qualquer resíduo conhecido pelos peritos na arte da conjugação de polímeros, obtido pela reacção do grupo activo no resíduo aminoácido do fragmento HMGB1 Box-A e o polímero ou o polímero activado por um grupo reactivo. Exemplos de grupos ligantes incluem sem limitação grupos alquilenos, amina, amida, carbamato, carboxilato, carbonilo, éster, éter, tioéter e dissulfídeo. Preferencialmente, o grupo ligante é uma ligação amino, a qual é obtida pela reacção do resíduo aminoácido N-terminal com o fragmento polímero activado com um grupo reactivo aldeído e subsequente redução.

Além disso, o grupo ligante pode opcionalmente conter um ou mais grupos espaçadores. No contexto do presente invento, um grupo espaçador é definido como um grupo bifuncional, possuindo em ambas as extremidades um grupo terminal funcional reactivo. Com um grupo terminal reactivo, o espaçador reage com o fragmento polímero ou com o grupo reactivo do fragmento polímero. Com o outro grupo funcional na outra extremidade, o grupo espaçador liga-se ao grupo funcional do resíduo aminoácido do fragmento de HMGB1 Box-A. Grupos espaçadores adequados são conhecidos pelos peritos na arte. Exemplos de grupos espaçadores incluem, mas não estão limitados por, pequenas moléculas ou polímeros hetero-, bi-funcionais. Por exemplo, o grupo espaçador pode ser representado por grupos alquilo C_6 - C_{12} bifuncionais ou grupos alquilo heterobifuncionais contendo 1-3 heteroátomos seleccionados a partir de N, S e O ou uma pequena cadeia PEG intermediária bifuncional.

A ligação covalente do polímero ao fragmento de HMGB1 Box-A para obter o conjugado polimérico do invento pode ser realizada através de conhecidas técnicas de síntese química. Por exemplo, numa concretização exemplificativa do presente invento, a conjugação do polímero pode ser realizada fazendo reagir um polímero N-hidroxisuccinimida (ex: NHS-PEG) com os grupos amina livres nos resíduos aminoácidos,

preferencialmente nos resíduos lisina, ou no aminoácido N-terminal do polipéptido HMGB1 Box-A. Em alternativa, a conjugação do polímero é realizada por reacção de um aldeído PEG com o N-terminal do polipéptido através de aminação redutiva. Mais, os conjugados poliméricos podem igualmente ser obtidos fazendo reagir um PEG-maleimida com um resíduo Cys do polipéptido ou variante de polipéptido de HMGB1 Box-A.

No contexto do presente invento, o termo "fragmento de HMGB1 Box-A" indica no composto conjugado polimérico o fragmento polipeptídico. Deste modo, este termo refere-se ao HMGB1 Box-A natural e aos seus fragmentos biologicamente activos bem como a variantes polipeptídicas de HMGB1-BoxA e aos seus fragmentos biologicamente activos.

No contexto do presente invento, quando é feita referência ao termo HMGB1 Box-A ou sequência de aminoácidos de HMGB1 Box-A", refere-se a HMGB1-Box humano e não humano. Numa concretização preferida do presente invento, o fragmento HMGB1 Box-A é derivado da proteína HMGB1 Box-A natural humana e da proteína HMGB1 Box-A natural de *Anopheles gambia*.

"Fragmentos biologicamente activos de HMGB1 Box-A" tal como aqui utilizado pretende abranger partes da conhecida proteína HMGB1 Box-A natural, para a qual pelo menos uma das actividades biológicas da correspondente proteína madura/mature é ainda observável quando são utilizados testes conhecidos. Preferencialmente, um fragmento da proteína madura/mature é considerado como biologicamente activo se puder ser determinada uma actividade antagonista em relação à actividade pró-inflamatória da HMGB1 B-Box e à proteína HMGB1 como um todo. Fragmentos biologicamente activos da HMGB1 Box-A natural são fragmentos com pelo menos 20, 25, 30, 35, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75 ou 80 aminoácidos. Fragmentos biologicamente activos preferidos da HMGB1 Box-A natural usados no contexto do presente invento compreende fragmentos com pelo menos 77 ou pelo menos 54 aminoácidos respectivamente.

O termo "mutação" tal como utilizado no contexto do presente invento pode ser entendido como substituição,

eliminação e/ou adição de um aminoácido individual na sequência alvo. Preferencialmente, a mutação da sequência alvo no presente invento é uma substituição. A substituição pode ocorrer com diferentes aminoácidos geneticamente codificados ou por aminoácidos não geneticamente codificados. Exemplos para aminoácidos não geneticamente codificados são homocisteína, hidroxiprolina, omitina, hidroxilisina, citrulina, carnitina, etc.

Numa concretização mais preferida do presente invento, as variantes do polipéptido de HMGB1 Box-A de um fragmento biologicamente activo do mesmo são obtidas utilizando uma processo de evolução direccionado, cuja tecnologia se encontra extensivamente descrita em WO 2004/022593 e em vários outros pedidos de patente (PCT/FR00/03503 PCT/FR01/01366, US 10/022,249, US 10/022,390, US 10/375,192, US 60/409,898, US 60/457,135, US 60/410,258 e US 60/410,263), todos em nome de Nautilus Biotech S.A. (Paris, France).

As variantes polipeptídicas do presente invento obtidas utilizando tecnologia de evolução direccionada são proteínas mutantes que diferem na sequência de aminoácidos da HMGB1 Box-A natural pela mutação de um ou mais aminoácidos individuais. Numa concretização muito preferida do presente invento, ocorre somente uma substituição de aminoácido na sequência da proteína nativa. É contudo abrangido pelo sujeito do presente invento que a proteína nativa pode ser ainda optimizada por substituição de uma pluralidade, por exemplo, de dois ou mais aminoácidos. As variantes polipeptídicas modificadas podem deste modo diferir da sequência da proteína natural por substituição de aminoácidos em 1-10, preferencialmente 2, 3, 4, 5 e 6 diferentes posições alvo de aminoácidos.

Em particular, as variantes polipeptídicas muito preferidas de HMGB1 Box-A ou de um seu fragmento biologicamente activo utilizado como fragmento de HMGB1 Box-A dos conjugados poliméricos do invento são aqueles descritos no pedido WO 2006/024547.

Em conformidade, numa concretização preferida do invento, o fragmento de HMGB1 Box-A do conjugado polimérico

é derivado a partir de HMGB1 Box-A humano. Em particular, um grupo de variantes polipeptídicas é derivado de mutações únicas introduzidas na sequência total de aminoácidos (84 aminoácidos) de HMGB1 Box-A humano (SEQ ID NO:1) (Fig. 1a). Estas variantes polipeptídicas preferidas são definidas nas sequências SEQ ID Nos: 2-116 (Fig. 1b).

Outras variantes polipeptídicas preferidas são obtidas partindo de fragmentos biologicamente activos de HMGB1 Box-A humano com 77 aminoácidos. (SEQ ID NO:117) (Fig. 2a) e 54 aminoácidos (SEQ ID NO:223) (Fig. 3a), respectivamente. As variantes polipeptídicas de Box-A do fragmento de HMGB1 humano com 77 aminoácidos são definidas nas sequências SEQ ID Nos: 118 a 222 (Fig. 2b). As variantes polipeptídicas e Box-A do fragmento de HMGB1 humano com 54 aminoácidos são definidas nas sequências SEQ ID Nos: 224 a 300 (Fig. 3b).

Numa outra concretização preferida do invento, o fragmento de HMGB1 Box-A do conjugado polimérico é derivado a partir de HMGB1 Box-A de *Anopheles gambia*. Em particular, um grupo de variantes polipeptídicas é derivado a partir de mutações únicas introduzidas na sequência total de aminoácidos (84 aminoácidos) de HMGB1 Box-A de *Anopheles gambia* (SEQ ID NO:301) (Fig. 4a). Estas variantes polipeptídicas são identificadas pelas sequências SEQ ID Nos: 302 a 418 (Fig. 4b). Outras variantes polipeptídicas preferidas são geradas a partir de fragmentos biologicamente activos de HMGB1 Box-A de *Anopheles gambia* com 77 aminoácidos (SEQ ID NO: 419) (Fig. 5a) e 54 aminoácidos (SEQ ID NO: 529) (Fig. 6a), respectivamente. As variantes polipeptídicas de Box-A de fragmento de HMGB1 com 77 aminoácidos são definidas nas sequências SEQ ID Nos: 420 a 528 (Fig. 5b). As variantes polipeptídicas de Box-A do fragmento de HMGB1 de *Anopheles gambia* (XP_31154) com 54 aminoácidos são definidas nas sequências Nos 530 a 610 (Fig. 6b).

De modo a identificar as variantes polipeptídicas mais preferidas de HMGB1 Box-A utilizadas como fragmento de HMGB1 Box-A do conjugados poliméricos do invento, foram efectuados estudos para determinar as variantes polipeptídicas que apresentem uma actividade similar ou mesmo melhorada e uma

maior resistência às proteases quando comparadas com a proteína HMGB1 Box-A natural. Para este efeito, a actividade das variantes polipeptídicas Box-A de HMGB1 Box-a humano com SEQ ID NO:1 na inibição da migração de células NIH/3T3 induzida por HMGB1 foi determinada em ensaios de quimiotaxia em comparação com a actividade antagonística do próprio HMGB1 Box-A humano (Exemplo 1 e Figuras 7.1 a 7.9). Além disso, para aquelas variantes polipeptídicas, que demonstrem uma actividade similar ou mesmo superior em relação à proteína HMGB1 Box-A de SEQ ID NO:1, a resistência *in vitro* em relação à digestão por protease foi determinada através de incubação de cada uma destas variantes polipeptídicas com uma mistura de tripsina, α -quimotripsina, endoproteinase Asp-N e endoproteinase Glu-C (sigma). Este teste de resistência à protease encontra-se descrito no Exemplo 2 e os resultados do perfil de resistência à protease das referidas variantes em comparação com HMGB1 Box-A nativa são apresentados nas Figuras 9.1 a 9.67.

A partir dos resultados pode ser adquirido que as variantes polipeptídicas preferidas de HMGB1 Box-A úteis como fragmento de HMGB1 Box-A do conjugado polimérico do presente invento são aquelas variantes que apresentem uma actividade antagonística similar ou superior em conjunto com uma maior resistência à protease. Em particular, as variantes polipeptídicas preferidas são os polipéptidos de SEQ ID NOs: 33, 35, 37-39, 42-45, 47-49, 52, 55, 57, 59, 62, 64, 67, 69 e 104. De entre estas variantes polipeptídicas preferidas, as variantes mais preferidas são as definidas nas SEQ ID Nos: 45, 49, 52, 55, 59, 64 e 67. Estas variantes polipeptídicas muito preferidas apresentam um perfil de resistência à protease dramaticamente superior quando comparado com HMGB1 Box-A natural humano de SEQ ID NO: 1 (ver resultados do Exemplo 2).

Note-se que os aminoácidos que ocorrem nas várias sequências de aminoácidos que aqui aparecem são identificados de acordo com as suas abreviaturas conhecidas de uma só letra. Deverá ainda notar-se que todas as sequências de resíduos de aminoácidos aqui representadas através do seu código abreviado de uma letra possuem uma orientação

esquerda-para-direita na direcção convencional de amino terminal para carboxi terminal.

No presente invento foi surpreendentemente determinado que os supramencionados conjugados poliméricos apresentam um desempenho farmacocinético e toxicológico melhorados, conduzindo a uma melhor biodisponibilidade quando comparada com o fragmento polipéptido HMGB1 Box-a não conjugado. Um efeito particularmente vantajoso da conjugação polimérica dos polipéptidos HMGB1 Box-a e suas variantes, e em particular da pegilação destes polipéptidos, em comparação com a forma não conjugada, é o aumento do volume hdrodinâmico das proteínas. Isto conduz a um melhoramento significativo e inesperado das propriedades farmacocinéticas dos compostos conjugados devido a evitar-se a eliminação renal, ou seja, redução da filtração glomerular.

Além disso, os conjugados poliméricos do invento apresentam maior resistência em relação à actividade proteolítica das proteases e/ou peptidases, em particular apresentam uma maior resistência em relação à actividade proteolítica das proteases e/ou peptidases humanas, em particular das proteases de soro humano e/ou proteases ou peptidases gastro-intestinais humanas.

Em particular, a resistência em relação à proteólise é de pelo menos 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 70%, 80%, 90%, 95% ou superior quando comparada com HMGB1 Box-A não conjugado. A resistência à protease foi medida em diferentes pontos no tempo (entre 5 minutos e 8 horas) a 25°C após incubação de 20 µg de Box-A natural ou variantes com uma mistura de proteases a 1% p/p de total de proteínas. A mistura das proteases foi preparada de fresco para cada ensaio a partir de soluções mãe de endoproteinase Glu-C (SIGMA) 200 µg/ml; tripsina (SIGMA) 400 µg/ml e α-quimiotripsina (SIGMA) 400 µg/ml. Após a incubação da protease a reacção foi terminada adicionando 10 µl de solução anti-proteases (Roche) e as amostras foram armazenadas a -20°C para o ensaio de actividade biológica.

Como consequência da maior estabilidade devida à maior resistência em relação à actividade das proteases, os conjugados poliméricos do presente invento apresentam também

uma maior semi-vida em fluidos corporais quando comparada com o HMGB1 Box-A não conjugado. Em particular, a semi-vida em soro e/ou em sangue é aumentada, sendo observado um aumento de pelo menos 10 minutos, 20 minutos, 30 minutos, 60 minutos ou mesmo superior, quando comparado com o HMGB1 Box-A não conjugado.

Devido ao aumento do volume hidrodinâmico das proteínas e também devido a uma maior resistência à proteólise e deste modo uma maior estabilidade, os conjugados poliméricos do invento apresentam igualmente propriedades terapêuticas e biológicas e actividade melhoradas. De facto, apresentam um perfil farmacocinético e farmacodinâmico mais favorável em relação à proteína HMGB1 Box-A não conjugada e variantes da proteína.

O invento é deste modo direccionado ao uso dos supramencionados conjugados poliméricos de HGMB1 Box-A como agente activo num medicamento.

Um outro aspecto do invento é pois o uso dos conjugados poliméricos inventivos no fabrico de um medicamento para a prevenção e/ou tratamento de patologias associadas a HGMB1 extra-celular ou patologias associadas com as proteínas homólogas a HMGB1. Em particular, as patologias associadas a HMGB1 são patologias que são mediadas por uma cascata de múltiplas citocinas pró-inflamatórias.

O largo espectro de estados patológicos induzidos pela quimiocina e pela cascata de citocinas inflamatórias HMGB1-induzidas estão agrupados nas seguintes categorias: doença inflamatória, doença autoimune, síndrome de resposta inflamatória sistémica, lesão de reperfusão após transplante de órgão, alterações cardiovasculares, doença obstétrica e ginecológica, doença infecciosa (viral e bacteriana), doença alérgica e atópica, patologias de tumores sólidos e não sólidos, doenças de rejeição de transplantes, doenças congénitas, doenças dermatológicas, doenças neurológicas, caquexia, doenças renais, estados de intoxicação iatrogénica, doenças metabólicas e idiopáticas.

As patologias associadas com HMGB1 de acordo com o presente invento são preferencialmente estados patológicos mediados pela activação da cascata de citocinas inflamatórias. Exemplos não limitativos que podem ser tratados de modo útil usando o presente invento incluem o largo espectro de estados patológicos induzidos pela HMGB1-quimiocina e pela cascata de citocinas inflamatórias HMGB1-induzidas agrupados nas seguintes categorias: restenose e outras doenças cardiovasculares, lesão de reperfusão, doenças inflamatórias tais como doença inflamatória intestinal, síndrome de resposta inflamatória sistémica, por exemplo, sépsia, síndrome de distúrbio respiratório em adultos, etc, doenças autoimunes tais como artrite reumatóide e osteoartrite, doenças obstétricas e ginecológicas, doenças infecciosas, doenças atópicas, tais como asma, eczema, etc, patologias tumorais, por exemplo doenças de tumores sólidos ou não sólidos associadas com transplantes de órgãos ou tecidos, tais como lesões de reperfusão após transplantes de órgãos, rejeição de órgãos e doença enxerto-versus-hospedeiro, doenças congénitas, doenças dermatológicas tais como psoríase ou alopecia, doenças neurológicas, doenças oftalmológicas, doenças renais, metabólicas ou idiopáticas e estados de intoxicação, por exemplo toxicidade iatrogénica e doença de Behçet, em que as doenças supra são provocadas por, associadas com e/ou acompanhadas de libertação de proteína HMGB1.

Em particular, as patologias pertencentes às doenças inflamatórias e autoimunes incluem artrite reumatóide/artropatias seronegativas, osteoartrite, doença inflamatória intestinal, doença de Crohn, enfarte intestinal, Lúpus eritematoso sistémico, iridoeilite/uveíte, neurite óptica, fibrose pulmonar idiopática, vasculite sistémica/granulomatose de Wegener, sarcoidose, orquite/procedimentos de reversão de vasectomia, esclerose sistémica e escleroderma. Resposta inflamatória sistémica inclui síndrome de sépsia (incluindo sépsia gram positiva, sépsia gram negativa, sépsia de cultura negativa, sépsia fúngica, febre neutropénica, urosépsia, conjuntivite séptica), meningococemia, trauma hemorrágico, zumbidos, exposição a radiação ionizante, prostatite aguda e crónica, pancreatite aguda e crónica, apendicite, úlceras péptica,

gástrica e duodenal, peritonite, colite ulcerativa, pseudomembranosa, aguda e duodenal, diverticulite, acalasia, colangite, colecistite, enterite, síndrome de distúrbio respiratório em adultos (ARDS). Lesão de reperfusão inclui síndrome pós-bomba e lesão isquemia-reperfusão. Doença cardiovascular inclui síndrome de aturdimento cardíaco, infarte do miocárdio e isquémia, aterosclerose, tromboflebite, endocardite, pericardite, falha cardíaca congestiva e restenose. Doenças obstétricas e ginecológicas incluem parto prematuro, endometriose, interrupção da gravidez, vaginite e infertilidade. Doenças infecciosas incluem infecção por HIV/neuropatia por HIV, meningite, hepatite B e C, infecção por herpes simplex, artrite séptica, peritinite, E.coli 0157:H7, pneumonia epiglote, síndrome urémico hemolítico/ purpura trombocitopénica, candidíase, filariose, amebíase, malária, febre Dengue hemorrágica, leishmaniose, lepra, síndrome de choque tóxico, miosite estreptocócica, gangrena gasosa, tuberculose mycobacterium, mycobacterium avium intracelular, pneumocistose carinii pneumonia, doença inflamatória pélvica, orquite/epididimiorquite, legionella, doença de Lyme, gripe A, vírus de Epstein-Barr, Citomegalovírus, síndrome hemiafagócito associado a vírus, encefalite viral/meningite aséptica. Doença alérgica e atópica inclui asma, alergia, choque anafilático, doença do complexo imunitário, febre dos fenos, rinite alérgica, eczema, dermatite alérgica de contacto, conjuntivite alérgica, pneumonite de hipersensibilidade. Neoplasias malignas (patologias de tumor líquido e sólido) incluem ALL, AML, CML, CLL, doença de Hodgkin, linfoma não Hodgkin, sarcoma de Kaposi, carcinoma colorectal, carcinoma nasofaríngeo, histiocitose maligna e síndrome paraneoplásico/hipercalcemia de neoplasias malignas. Doenças após transplantes incluem rejeição de transplante de órgãos e doença enxerto-versus-hospedeiro. Doença congénita inclui fibrose cística, linfocitose hematofagócita familiar e anemia das células falciformes. Doença dermatológica inclui psoríase, artrite psoriática e alopecia. Doença neurológica inclui doenças neurodegenerativas (esclerose múltipla, enxaqueca, dor de cabeça, patologias associadas à amiloide, doenças do prião/ doença de Creutzfeld-Jacob), doenças de Alzheimer e Parkinson, esclerose múltipla, esclerose amiotrófica hemilateral) e

neuropatias periféricas, enxaqueca, dor de cabeça. Doença renal inclui síndrome nefrótico, hemodiálise e uremia. Estado de intoxicação latrogénico inclui terapia OKT3, terapia anti-CD3, terapia de citocina, quimioterapia, terapia por radiação e intoxicação por salicilatos crónica, doença metabólica e idiopática inclui doença de Wilson, hemocromatose, deficiência de alfa-1 antitripsina, diabetes e complicações por diabetes, perda de peso, anorexia, caquexia, obesidade, tiroidite de Hashimoto, osteoporose, avaliação do eixo hipotalâmico-pituitário-adrenal e cirrose biliar primária. Doença oftalmológica inclui glaucoma, retinopatias e olho seco. Uma miscelânea de outras patologias compreende: síndrome de disfunção de múltiplos órgãos, distrofia muscular, meningite séptica, aterosclerose, epiglote, doença de Whipple, asma, alergia, rinite alérgica, necrose de órgãos, febre, septicemia, choque endotóxico, hiperpirexia, granuloma eosinofílico, granulomatose, sarcoidose, aborto séptico, uretrite, enfizema, rinite, alveolite, bronquiolite, faringite, disfunções da barreira epitelial, pneumoultramicroscopicossilico vulcanoconiose, pleuresia, sinusite, gripe, infecção respiratória por vírus sincicial, bacteremia disseminada, cisto hidático, queimaduras, queimaduras solares, urticária, verrugas, pápulas, vasulite, angiite, miocardite, arterite, periarterite nodosa, febre reumática, doença celíaca, encefalite, embolismo cerebral, síndrome de Guillame-Barre, neurite, neuralgia, complicações iatrogénicas/lesões do nervo periférico, lesão na espinal medula, paralisia, uveíte, artrite, artralguas, osteomielite, fascite, doença de Paget, gota, doença periodontal, sinovite, miastenia gravis, síndrome de goodpasture, síndrome de Behçet, espondilite anquilosante, doença de Barger, síndrome de Retier, dermatite bolhosa (penfigóide bolhoso), pênfigo e pênfigo vulgaris e alopecia.

Numa outra concretização preferida, os compostos poliméricos do invento são usados como agentes activos para a prevenção, alívio e/ou tratamento de patologias associadas com RAGE. As patologias associadas com RAGE são definidas como estados patológicos associados com um aumento da expressão do RAGE.

O RAGE (Receptor para produtos finais de Glicação Avançada) é um membro multi-ligando da superfamília das imunoglobulinas das moléculas da superfície celular. É composto por três regiões tipo imunoglobulina (um domínio imunoglobulina tipo V seguido por dois domínios imunoglobulina tipo C), um domínio transmembrana e uma curta extremidade citosólica altamente carregada que é essencial para a sinalização pós-RAGE. O RAGE foi identificado pela primeira vez em 1992 como um alvo de ligação para AGEs, proteínas não enzimaticamente glicosiladas e oxidadas que se acumulam no tecido vascular com o envelhecimento e uma taxa acelerada nos diabetes. O RAGE é expressado numa ampla gama de células, incluindo células endoteliais, células do músculo liso, fagócitos mononucleares e neurónios. Apesar de estar presente em níveis elevados durante o desenvolvimento, especialmente no sistema nervoso central, os seus níveis decaem durante a maturidade.

Tal como anteriormente reportado, o RAGE foi o primeiro receptor identificado para HMGB1 extracelular. O HMGB1 que se une na superfície celular induz a sobre-regulação transcripcional do RAGE. Exemplos de patologias relacionados com RAGE são diabetes e distúrbios associados com diabetes tais como vasculopatia diabética, neuropatia, retinopatia e outros distúrbios, incluindo doença de Alzheimer e reacções imunes/inflamatórias das paredes dos vasos. Um exemplo muito preferido de patologias relacionadas com RAGE neste contexto é a diabetes do tipo I e/ou do tipo II.

Num outro aspecto do invento, o uso de conjugados poliméricos HMGB1 Box-A anteriormente descritos é em combinação com um outro agente activo.

O outro agente é preferencialmente um agente capaz de inibir um mediador precoce da cascata de citocinas inflamatórias. Preferencialmente, este outro agente é um antagonista ou inibidor de uma citocina seleccionado a partir do grupo que consiste em TNF, IL-1 α , IL-1 β , IL-Ra, IL-6, IL-8, IL-10, IL 13, IL-18, IFN- γ MIP-1 α , MIF-1 β , MIP-2, MIF e PAF.

O outro agente usado em combinação com o conjugado polimérico, pode igualmente ser um inibidor do RAGE, por exemplo um anticorpo direccionado ao RAGE, um ácido nucleico ou análogo de ácido nucleico capaz de inibir a expressão de RAGE, por exemplo uma molécula antisense, uma ribozima ou um molécula de interferência com o ARN, ou uma pequena molécula sintética antagonista da interacção de HMGB1 com o RAGE, preferencialmente da interacção da forma não acetilada e/ou forma acetilada de HGE, ou RAGE solúvel (sRAGE). O anticorpo para RAGE é preferencialmente um anticorpo monoclonal, mais preferencialmente um anticorpo quimérico ou humanizado ou anticorpo recombinante, tal como um anticorpo de cadeia única ou um fragmento ligado a antigene desse anticorpo. O análogo RAGE solúvel pode estar opcionalmente presente sob a forma de uma proteína de fusão, por exemplo com o domínio Fc de um anticorpo humano. O pequeno antagonista molecular sintético da interacção de HMGB1 com RAGE possui preferencialmente um peso molecular inferior a 1000 Dalton. O pequeno antagonista molecular sintético inibe preferencialmente a interacção do RAGE com a forma não acetilada ou/e com a forma acetilada de HMGB1 e com a forma não acetilada ou/e com a forma acetilada das proteínas homólogas a HMGB1, particularmente HMGB2, HMGB3, HMG-1 L10, HMG-4L ou/e SP100-HMG.

O outro agente usado em combinação com o conjugado polimérico, pode igualmente ser um inibidor da interacção de um receptor tipo Toll (TLR), por exemplo de LR2, TLR4, TLR7, TLR8 ou/e TLR9, com HMGB1, inibidor esse que é preferencialmente um anticorpo monoclonal ou policlonal, um ácido nucleico ou análogo de ácido nucleico capaz de inibir a expressão de TLR, por exemplo uma molécula antisense, uma ribozima ou molécula de interferência com o ARN, ou uma molécula sintética preferencialmente com uma dimensão inferior a 1000 Dalton. O inibidor pode ser um inibidor conhecido de um receptor tipo Toll, em particular de TLR2, TLR4, TLR7, TLR8 ou/e TLR9. O inibidor inibe preferencialmente a interacção do receptor tipo Toll com a forma não acetilada ou/e a forma acetilada de HMGB1.

Ainda numa outra concretização, o outro agente é o domínio funcional N-terminal tipo lecitina (D1) de trombomodulina. O domínio D1 de trombomodulina é capaz de

interceptar a forma não acetilada e/ou a forma acetilada de HMGB1 libertado e de proteínas homólogas a HMGB1 libertadas, em particular HMGB2, HMGB3, HMG-1L10, HMG-4L ou/e SP100-HMG, evitando deste modo a sua interacção com RAGE e receptores tipo Toll. O domínio D1 da trombomodulina pode ser nativa ou mutado de modo a torná-lo resistente às proteases.

O outro agente pode igualmente ser um ácido nucleico sintético de duplo filamento ou molécula análoga a ácido nucleico com uma estrutura de forma curvada, particularmente uma estrutura ADN, ANP ou ADN/ANP quimera ou híbrido curvado de duplo filamento, ou uma estrutura ADN, ANP ou ADN/ANP quimera ou híbrido de duplo filamento cruciforme capaz de se ligar à proteína HMGB1. Ácidos nucleicos e moléculas análogas a ácido nucleico preferidos são divulgados num pedido de patente co-propriedade e co-pendente N° Wo 2006/002971 depositado em 4 de Julho de 2005 (reivindicando prioridade do pedido provisional US N° 60/584,678 depositado em 2 de Julho de 2004). O ácido nucleico sintético de duplo filamento ou molécula análoga a ácido nucleico com uma estrutura de forma curvada é preferencialmente capaz de se ligar à forma não acetilada ou/e à forma acetilada de HMGB1 e a forma não acetilada ou/e a forma acetilada de proteínas homólogas de HMGB1, em particular HMGB2, HMGB3, HMG-1L10, HMG4L e/ou SP-100-HMG.

Numa outra concretização, o outro agente usado em combinação com o conjugado polimérico é K-252a e/ou um sal ou derivado do mesmo ou um conjugado polimérico de K-252a e/ou de um seu derivado. O uso de K-252a ou conjugados poliméricos de K-252a e seus derivados é divulgado num pedido de patente em co-propriedade e co-pendente WO 2007/02299 depositado em 25 de Agosto de 2005.

Deste modo, um outro aspecto do presente invento é uma composição farmacêutica compreendendo uma quantidade eficaz de pelo menos um dos conjugados poliméricos de polipéptido ou variante de polipéptido de HMGB1 Box-A ou de um seu fragmento biologicamente activo como ingrediente activo para o tratamento de patologias associadas à HMGB1 e suportes, diluentes e/ou adjuvantes farmacêuticamente aceitáveis. A composição farmacêutica do presente invento é

preferencialmente adequada para o tratamento de patologias associadas com a forma não acetilada ou/e a forma acetilada de HMGB1 e/ou de proteínas homólogas de HMGB1. Numa outra concretização preferida, a composição farmacêutica do presente invento compreendendo pelo menos um conjugado polimérico compreende ainda um outro agente tal como anteriormente definido. A composição farmacêutica do presente invento pode ser usada para diagnóstico ou para aplicações terapêuticas.

A formulação, via de administração e dosagem exactas podem ser escolhidas por o médico em causa tendo em linha de conta as condições do paciente. A administração pode ser obtida numa dose única ou em doses repetidas em intervalos. A quantidade de dosagem e intervalo podem ser ajustados individualmente de modo a proporcionar o efeito terapêutico que resulta na melhora dos sintomas ou num prolongamento da sobrevivência do paciente. A quantidade efectiva de composição administrada dependerá, como é óbvio, do sujeito a ser tratado, do peso do sujeito, da severidade da aflição, do modo de administração e da decisão do médico prescriptor. Uma dose diária adequada será entre 0,001 a 10 mg/kg, particularmente 0,1 a 5 mg/kg.

A administração pode ser realizada através de métodos conhecidos, por exemplo por injeção, em particular por injeção intravenosa, intramuscular, transmucosal, subcutânea ou intraperitoneal e/ou por aplicação oral, tópica, nasal, inaladora, aerossol e/ou rectal, etc. A administração pode ser local ou sistémica.

Além disso os conjugados poliméricos de Box-A de fragmento de HMGB1 objecto deste invento podem ser, de modo reversível, immobilizados e/ou adsorvidos na superfície e/ou no interior de dispositivos médicos ou sistemas de libertação/veiculação de fármacos (microesferas). Os dispositivos médicos e microesferas podem ser carregados de modo reversível com os conjugados poliméricos deste invento, através da sua união, impregnação e/ou adsorção na superfície do dispositivo médico ou da microesfera ou na camada que reveste a sua superfície. Quando o dispositivo médico ou a microesfera entra em contacto com os fluidos biológicos, o

conjugado polimérico imobilizado em modo reversível é libertado. Deste modo, o dispositivo médico e a microesfera actuam como ferramentas de libertação do fármaco que eluem a molécula objecto deste invento de um tal modo que a cinética da sua libertação pode ser controlada, assegurando libertação controlada ou constante, conforme requerido pelo tratamento. Os métodos para revestimento/impregnação dos dispositivos médicos e carga das microesferas são bem conhecidos pelos peritos nestas tecnologias.

Deste modo, um outro aspecto deste invento é o uso dos conjugados poliméricos de Box-A de HMGB1, em que moléculas conjugadas são imobilizadas de modo reversível na superfície dos dispositivos médicos ou das microesferas ou se encontram adsorvidos nos mesmos. Estes instrumentos médicos são preferencialmente instrumentos cirúrgicos, implantes, catéteres ou endopróteses, por exemplo endopróteses para angioplastia e, em particular, endopróteses farmacológicas.

Outro aspecto do invento diz respeito a um dispositivo médico revestido de modo reversível com pelo menos um conjugado polimérico do invento. Tal dispositivo pode ser seleccionado a partir de instrumentos cirúrgicos, implantes, catéteres ou endopróteses. Tal dispositivo pode ser útil para angioplastia.

O invento é ainda ilustrado pelas figuras seguintes:

A Fig. 1a apresenta a sequência de aminoácidos da HMGB1 Box-A nativa constituída por 84 resíduos aminoácido (SEQ ID NO:1)

A Fig.1b apresenta o tipo de aminoácidos substituintes nas respectivas posições alvo seleccionados para gerar a variante polipeptídica de HMGB1 Box-A de longitude completa. Mais, as sequências específicas de aminoácidos da variante polipeptídica gerada são apresentadas nas SEQ ID Nos: 2 a 116.

A Fig. 2a apresenta a sequência de aminoácidos do fragmento biologicamente activo de HMGB1 Box-A Humano constituído por 77 resíduos aminoácido (SEQ ID NO:117).

A Fig. 2b representa o tipo de aminoácidos substituintes nas respectivas posições alvo seleccionados para gerar a variante polipeptídica do fragmento biologicamente activo de HMGB1 Box-A Humano constituído por 77 resíduos aminoácidos. Mais, as sequências específicas de aminoácidos da variante polipeptídica gerada são apresentadas nas SEQ ID Nos: 118 a 222.

A Fig. 3a apresenta a sequência de aminoácidos do fragmento biologicamente activo de HMGB1 Box-A Humano constituído por 54 resíduos aminoácido (SEQ ID NO:223).

A Fig. 3b representa o tipo de aminoácidos substituintes nas respectivas posições alvo seleccionados para gerar a variante polipeptídica do fragmento biologicamente activo de HMGB1 Box-A Humano constituído por 54 resíduos aminoácidos. Mais, as sequências específicas de aminoácidos da variante polipeptídica gerada são apresentadas nas SEQ ID Nos: 224 a 300.

A Fig. 4a apresenta a sequência de aminoácidos de HMGB1 Box-A nativa de *Anopheles gambia* constituído por 84 resíduos aminoácido (SEQ ID NO:301).

A Fig. 4b representa o tipo de aminoácidos substituintes nas respectivas posições alvo seleccionados para gerar a variante polipeptídica de HMGB1 Box-A de *Anopheles gambia* de longitude completa. Mais, as sequências específicas de aminoácidos da variante polipeptídica gerada são apresentadas nas SEQ ID Nos: 302 a 418.

A Fig. 5a apresenta a sequência de aminoácidos do fragmento biologicamente activo de HMGB1 Box-A de *Anopheles gambia* constituído por 77 resíduos aminoácido (SEQ ID NO:419).

A Fig. 5b representa o tipo de aminoácidos substituintes nas respectivas posições alvo seleccionados para gerar a variante polipeptídica do fragmento biologicamente activo de HMGB1 Box-A de *Anopheles gambia* constituído por 77 resíduos aminoácido. Mais, as sequências específicas de aminoácidos da variante polipeptídica gerada são apresentadas nas SEQ ID Nos: 420 a 528.

A Fig. 6a apresenta a sequência de aminoácidos do fragmento biologicamente activo de HMGB1 Box-A de *Anopheles gambia* constituído por 54 resíduos aminoácido (SEQ ID NO:529).

A Fig. 6b representa o tipo de aminoácidos substituintes nas respectivas posições alvo seleccionados para gerar a variante polipeptídica do fragmento biologicamente activo de HMGB1 Box-A de *Anopheles gambia* constituído por 54 resíduos aminoácido. Mais, as sequências específicas de aminoácidos da variante polipeptídica gerada são apresentadas nas SEQ ID Nos: 530 a 610.

As Figuras e Tabelas 7.1 a 7.9 mostram os resultados do ensaio de quimiotaxia descrito do Exemplo 1 realizado nas variantes polipeptídicas de HMGB1 Box-A de SEQ ID NO:2 a SEQ ID NO:116 usadas como fragmento de HMGB1 Box-A dos conjugados poliméricos do presente invento. Em cada figura a actividade de uma série de variantes polipeptídicas na inibição da migração de células NIH/3T3 induzida por HMGB1 é testada em comparação com a actividade do fragmento de HMGB1 Box-A humano natural de longitude completa de SEQ ID NO:1. Cada figura mostra uma tabela que reporta os dados numéricos da análise estatística e um gráfico de barras em coluna mostrando os resultados do ensaios de quimiotaxia.

A Figura 7.1 e Tabela 7.1 apresentam o gráfico de barras e dados estatísticos dos resultados dos ensaios de quimiotaxia de inibição de migração de células NIH/3T3 induzida por HMGB1 através de HMGB1 Box-A natural humano de SEQ ID NO:1 (CT500) e variantes polipeptídicas de SEQ ID NO:2 a 15 (identificados na Tabela e Figura com o código CT501, CT568, CT569, CT570, CT571, CT502, CT572, CT503, CT573, CT504, CT574, CT575, CT576 e CT505, respectivamente).

A Figura 7.2 e Tabela 7.2 apresentam o gráfico de barras e dados estatísticos dos resultados dos ensaios de quimiotaxia de inibição de migração de células NIH/3T3 induzida por HMGB1 através de HMGB1 Box-A natural humano de SEQ ID NO:1 (CT500) e variantes polipeptídicas de SEQ ID NOs: 16 a 23 e 25-29 (identificados na Tabela e Figura com o código CT577, CT578, CT506, CT579, CT580, CT581, CT507, CT582, CT584, CT508, CT509, CT510 e CT585, respectivamente).

A Figura 7.3 e Tabela 7.3 apresentam o gráfico de barras e dados estatísticos dos resultados dos ensaios de quimiotaxia de inibição de migração de células NIH/3T3 induzida por HMGB1 através de HMGB1 Box-A natural humano de SEQ ID NO:1 (CT500) e variantes polipeptídicas de SEQ ID NOs: 30-35 e 37-43 (identificados na Tabela e Figura com o código CT511, CT512, CT513, CT514, CT586, CT515, CT516, CT517, CT518, CT519, CT520, CT521 e CT522, respectivamente).

A Figura 7.4 e Tabela 7.4 apresentam o gráfico de barras e dados estatísticos dos resultados dos ensaios de quimiotaxia de inibição de migração de células NIH/3T3 induzida por HMGB1 através de HMGB1 Box-A natural humano de SEQ ID NO:1 (CT500) e variantes polipeptídicas de SEQ ID NOs: 44-57 (identificados na Tabela e Figura com o código CT523, CT524, CT525, CT526, CT527, CT528, CT588, CT529, CT530, CT589, CT590, CT531, CT591 e CT532, respectivamente).

A Figura 7.6 e Tabela 7.6 apresentam o gráfico de barras e dados estatísticos dos resultados dos ensaios de quimiotaxia de inibição de migração de células NIH/3T3 induzida por HMGB1 através de HMGB1 Box-A natural humano de SEQ ID NO:1 (CT500) e variantes polipeptídicas de SEQ ID NOs: 72-85 (identificados na Tabela e Figura com o código CT596, CT597, CT598, CT599, CT600, CT601, CT602, CT603, CT543, CT544, CT545, CT546, CT547 e CT604, respectivamente).

A Figura 7.7 e Tabela 7.7 apresentam o gráfico de barras e dados estatísticos dos resultados dos ensaios de quimiotaxia de inibição de migração de células NIH/3T3 induzida por HMGB1 através de HMGB1 Box-A natural humano de SEQ ID NO:1 (CT500) e variantes polipeptídicas de SEQ ID NOs: 86-99 (identificados na Tabela e Figura com o código CT548, CT549, CT605, CT606, CT607, CT608, CT609, CT610, CT550, CT551, CT611, CT552, CT553 e CT554, respectivamente).

A Figura 7.8 e Tabela 7.8 apresentam o gráfico de barras e dados estatísticos dos resultados dos ensaios de quimiotaxia de inibição de migração de células NIH/3T3 induzida por HMGB1 através de HMGB1 Box-A natural humano de SEQ ID NO:1 (CT500) e variantes polipeptídicas de SEQ ID NOs: 100-113 (identificados na Tabela e Figura com o código CT555,

CT556, CT557, CT558, CT559, CT612, CT560, CT561, CT613, CT562, CT563, CT564, CT565 e CT566, respectivamente).

A Figura 7.9 e Tabela 7.9 apresentam o gráfico de barras e dados estatísticos dos resultados dos ensaios de quimiotaxia de inibição de migração de células NIH/3T3 induzida por HMGB1 através de HMGB1 Box-A natural humano de SEQ ID NO:1 (CT500) e variantes polipeptídicas de SEQ ID NOs: 114-116 (identificados na Tabela e Figura com o código CT567, CT614 e CT615, respectivamente).

A Fig. 8 apresenta a imagem de gel SDS-PAGE com Tricina carregado com HMGB1 Box-A natural humano da SEQ ID NO:1 (CT500) em diferentes pontos no tempo após digestão por protease da prova de resistência à protease descrita no Exemplo 2. A proteína Box-A natural testada em relação à resistência à protease é uma proteína marcada com His. Após 5 minutos de digestão a CT500 apresenta duas bandas principais, uma correspondente à proteína original na amostra e a segunda correspondendo à proteína de 84 aminoácidos sem a marca de His N-terminal (indicada na figura com uma seta). O perfil desta segunda banda apresenta resistência às proteases durante 30 minutos. As bandas menores presentes neste e em outros géis da Fig 9.1 a 9.67 correspondem a fragmentos digeridos de Box-A.

As Fig.9.1 a Fig. 9,7 apresentam a imagem de gel Tricina SDS-PAGE carregado com as variantes polipeptídicas do fragmento de HMGB1 Box-A dos conjugados poliméricos do presente invento em diferentes pontos no tempo após digestão por protease da prova de resistência à protease descrita no Exemplo 2. As variantes polipeptídicas de Box-A testadas em relação à resistência à protease são proteínas marcadas com His. Após 5 minutos de digestão a imagem de gel SDS-PAGE apresenta duas bandas principais, uma correspondente à variante de proteína original na amostra e a segunda correspondendo à variante da proteína de 84 aminoácidos Box-A sem a marca de His N-terminal (indicada na figura com uma seta). O perfil desta segunda banda apresenta resistência às proteases durante 30 minutos. As bandas menores presentes neste e em outros géis da Fig 9.1 a 9.67 correspondem a fragmentos digeridos de Box-A.

A Figura 9.1 apresenta o SDS-PAGE com Tricina da variante polipeptídica de SEQ ID NO:2 (CT501) em diferentes pontos no tempo após digestão por protease.

A Figura 9.2 apresenta o SDS-PAGE com Tricina da variante polipeptídica de SEQ ID NO:7 (CT502) em diferentes pontos no tempo após digestão por protease.

A Figura 9.3 apresenta o SDS-PAGE com Tricina da variante polipeptídica de SEQ ID NO:9 (CT503) em diferentes pontos no tempo após digestão por protease.

A Figura 9.5 apresenta o SDS-PAGE com Tricina da variante polipeptídica de SEQ ID NO:15 (CT505) em diferentes pontos no tempo após digestão por protease.

A Figura 9.6 apresenta o SDS-PAGE com Tricina da variante polipeptídica de SEQ ID NO:18 (CT506) em diferentes pontos no tempo após digestão por protease.

A Figura 9.7: Tricina SDS-PAGE da variante polipeptídica de SEQ ID NO:22 (CT507) em diferentes pontos no tempo após digestão por protease.

A Figura 9.8 apresenta o SDS-PAGE com Tricina da variante polipeptídica de SEQ ID NO:26 (CT508) em diferentes pontos no tempo após digestão por protease.

A Figura 9.9 apresenta o SDS-PAGE com Tricina da variante polipeptídica de SEQ ID NO:27 (CT509) em diferentes pontos no tempo após digestão por protease.

A Figura 9.10 apresenta o SDS-PAGE com Tricina da variante polipeptídica de SEQ ID NO:28 (CT510) em diferentes pontos no tempo após digestão por protease.

A Figura 9.11 apresenta o SDS-PAGE com Tricina da variante polipeptídica de SEQ ID NO:30 (CT511) em diferentes pontos no tempo após digestão por protease.

A Figura 9.12 apresenta o SDS-PAGE com Tricina da variante polipeptídica de SEQ ID NO:31 (CT512) em diferentes pontos no tempo após digestão por protease.

A Figura 9.13 apresenta o SDS-PAGE com Tricina da variante polipeptídica de SEQ ID NO:32 (CT513) em diferentes pontos no tempo após digestão por protease.

A Figura 9.14 apresenta o SDS-PAGE com Tricina da variante polipeptídica de SEQ ID NO:33 (CT514) em diferentes pontos no tempo após digestão por protease.

A Figura 9.15 apresenta o SDS-PAGE com Tricina da variante polipeptídica de SEQ ID NO:35 (CT515) em diferentes pontos no tempo após digestão por protease.

A Figura 9.16 apresenta o SDS-PAGE com Tricina da variante polipeptídica de SEQ ID NO:37 (CT516) em diferentes pontos no tempo após digestão por protease.

A Figura 9.17 apresenta o SDS-PAGE com Tricina da variante polipeptídica de SEQ ID NO:38 (CT517) em diferentes pontos no tempo após digestão por protease.

A Figura 9.18 apresenta o SDS-PAGE com Tricina da variante polipeptídica de SEQ ID NO:39 (CT518) em diferentes pontos no tempo após digestão por protease.

A Figura 9.19 apresenta o SDS-PAGE com Tricina da variante polipeptídica de SEQ ID NO:40 (CT519) em diferentes pontos no tempo após digestão por protease.

A Figura 9.20 apresenta o SDS-PAGE com Tricina da variante polipeptídica de SEQ ID NO:41 (CT520) em diferentes pontos no tempo após digestão por protease.

A Figura 9.21 apresenta o SDS-PAGE com Tricina da variante polipeptídica de SEQ ID NO:42 (CT521) em diferentes pontos no tempo após digestão por protease.

A Figura 9.22 apresenta o SDS-PAGE com Tricina da variante polipeptídica de SEQ ID NO:43 (CT522) em diferentes pontos no tempo após digestão por protease.

A Figura 9.23 apresenta o SDS-PAGE com Tricina da variante polipeptídica de SEQ ID NO:44 (CT523) em diferentes pontos no tempo após digestão por protease.

A Figura 9.24 apresenta o SDS-PAGE com Tricina da variante polipeptídica de SEQ ID NO:45 (CT524) em diferentes pontos no tempo após digestão por protease.

A Figura 9.25 apresenta o SDS-PAGE com Tricina da variante polipeptídica de SEQ ID NO:46 (CT525) em diferentes pontos no tempo após digestão por protease.

A Figura 9.26 apresenta o SDS-PAGE com Tricina da variante polipeptídica de SEQ ID NO:47 (CT526) em diferentes pontos no tempo após digestão por protease.

A Figura 9.27 apresenta o SDS-PAGE com Tricina da variante polipeptídica de SEQ ID NO:48 (CT527) em diferentes pontos no tempo após digestão por protease.

A Figura 9.28 apresenta o SDS-PAGE com Tricina da variante polipeptídica de SEQ ID NO:49 (CT528) em diferentes pontos no tempo após digestão por protease.

A Figura 9.29 apresenta o SDS-PAGE com Tricina da variante polipeptídica de SEQ ID NO:51 (CT529) em diferentes pontos no tempo após digestão por protease.

A Figura 9.30 apresenta o SDS-PAGE com Tricina da variante polipeptídica de SEQ ID NO:52 (CT530) em diferentes pontos no tempo após digestão por protease.

A Figura 9.31 apresenta o SDS-PAGE com Tricina da variante polipeptídica de SEQ ID NO:55 (CT531) em diferentes pontos no tempo após digestão por protease.

A Figura 9.32 apresenta o SDS-PAGE com Tricina da variante polipeptídica de SEQ ID NO:57 (CT532) em diferentes pontos no tempo após digestão por protease.

A Figura 9.33 apresenta o SDS-PAGE com Tricina da variante polipeptídica de SEQ ID NO:59 (CT533) em diferentes pontos no tempo após digestão por protease.

A Figura 9.34 apresenta o SDS-PAGE com Tricina da variante polipeptídica de SEQ ID NO:61 (CT534) em diferentes pontos no tempo após digestão por protease.

A Figura 9.35 apresenta o SDS-PAGE com Tricina da variante polipeptídica de SEQ ID NO:62 (CT535) em diferentes pontos no tempo após digestão por protease.

A Figura 9.36 apresenta o SDS-PAGE com Tricina da variante polipeptídica de SEQ ID NO:63 (CT536) em diferentes pontos no tempo após digestão por protease.

A Figura 9.37 apresenta o SDS-PAGE com Tricina da variante polipeptídica de SEQ ID NO:64 (CT537) em diferentes pontos no tempo após digestão por protease.

A Figura 9.38 apresenta o SDS-PAGE com Tricina da variante polipeptídica de SEQ ID NO:66 (CT538) em diferentes pontos no tempo após digestão por protease.

A Figura 9.39 apresenta o SDS-PAGE com Tricina da variante polipeptídica de SEQ ID NO:67 (CT539) em diferentes pontos no tempo após digestão por protease.

A Figura 9.40 apresenta o SDS-PAGE com Tricina da variante polipeptídica de SEQ ID NO:69 (CT540) em diferentes pontos no tempo após digestão por protease.

A Figura 9.41 apresenta o SDS-PAGE com Tricina da variante polipeptídica de SEQ ID NO:70 (CT541) em diferentes pontos no tempo após digestão por protease.

A Figura 9.42 apresenta o SDS-PAGE com Tricina da variante polipeptídica de SEQ ID NO:71 (CT542) em diferentes pontos no tempo após digestão por protease.

A Figura 9.43 apresenta o SDS-PAGE com Tricina da variante polipeptídica de SEQ ID NO:80 (CT543) em diferentes pontos no tempo após digestão por protease.

A Figura 9.44 apresenta o SDS-PAGE com Tricina da variante polipeptídica de SEQ ID NO:81 (CT544) em diferentes pontos no tempo após digestão por protease.

A Figura 9.45 apresenta o SDS-PAGE com Tricina da variante polipeptídica de SEQ ID NO:82 (CT545) em diferentes pontos no tempo após digestão por protease.

A Figura 9.46 apresenta o SDS-PAGE com Tricina da variante polipeptídica de SEQ ID NO:83 (CT546) em diferentes pontos no tempo após digestão por protease.

A Figura 9.47 apresenta o SDS-PAGE com Tricina da variante polipeptídica de SEQ ID NO:84 (CT547) em diferentes pontos no tempo após digestão por protease.

A Figura 9.48 apresenta o SDS-PAGE com Tricina da variante polipeptídica de SEQ ID NO:86 (CT548) em diferentes pontos no tempo após digestão por protease.

A Figura 9.49 apresenta o SDS-PAGE com Tricina da variante polipeptídica de SEQ ID NO:87 (CT549) em diferentes pontos no tempo após digestão por protease.

A Figura 9.50 apresenta o SDS-PAGE com Tricina da variante polipeptídica de SEQ ID NO:94 (CT550) em diferentes pontos no tempo após digestão por protease.

A Figura 9.51 apresenta o SDS-PAGE com Tricina da variante polipeptídica de SEQ ID NO:95 (CT551) em diferentes pontos no tempo após digestão por protease.

A Figura 9.52 apresenta o SDS-PAGE com Tricina da variante polipeptídica de SEQ ID NO:97 (CT552) em diferentes pontos no tempo após digestão por protease.

A Figura 9.53 apresenta o SDS-PAGE com Tricina da variante polipeptídica de SEQ ID NO:98 (CT553) em diferentes pontos no tempo após digestão por protease.

A Figura 9.54 apresenta o SDS-PAGE com Tricina da variante polipeptídica de SEQ ID NO:99 (CT554) em diferentes pontos no tempo após digestão por protease.

A Figura 9.55 apresenta o SDS-PAGE com Tricina da variante polipeptídica de SEQ ID NO:100 (CT555) em diferentes pontos no tempo após digestão por protease.

A Figura 9.56 apresenta o SDS-PAGE com Tricina da variante polipeptídica de SEQ ID NO:101 (CT556) em diferentes pontos no tempo após digestão por protease.

A Figura 9.57 apresenta o SDS-PAGE com Tricina da variante polipeptídica de SEQ ID NO:102 (CT557) em diferentes pontos no tempo após digestão por protease.

A Figura 9.58 apresenta o SDS-PAGE com Tricina da variante polipeptídica de SEQ ID NO:103 (CT558) em diferentes pontos no tempo após digestão por protease.

A Figura 9.59 apresenta o SDS-PAGE com Tricina da variante polipeptídica de SEQ ID NO:104 (CT559) em diferentes pontos no tempo após digestão por protease.

A Figura 9.60 apresenta o SDS-PAGE com Tricina da variante polipeptídica de SEQ ID NO:106 (CT560) em diferentes pontos no tempo após digestão por protease.

A Figura 9.61 apresenta o SDS-PAGE com Tricina da variante polipeptídica de SEQ ID NO:107 (CT561) em diferentes pontos no tempo após digestão por protease.

A Figura 9.62 apresenta o SDS-PAGE com Tricina da variante polipeptídica de SEQ ID NO:109 (CT562) em diferentes pontos no tempo após digestão por protease.

A Figura 9.63 apresenta o SDS-PAGE com Tricina da variante polipeptídica de SEQ ID NO:110 (CT563) em diferentes pontos no tempo após digestão por protease.

A Figura 9.64 apresenta o SDS-PAGE com Tricina da variante polipeptídica de SEQ ID NO:111 (CT564) em diferentes pontos no tempo após digestão por protease.

A Figura 9.65 apresenta o SDS-PAGE com Tricina da variante polipeptídica de SEQ ID NO:112 (CT565) em diferentes pontos no tempo após digestão por protease.

A Figura 9.66 apresenta o SDS-PAGE com Tricina da variante polipeptídica de SEQ ID NO:113 (CT566) em diferentes pontos no tempo após digestão por protease.

A Figura 9.67 apresenta o SDS-PAGE com Tricina da variante polipeptídica de SEQ ID NO:19 (CT567) em diferentes pontos no tempo após digestão por protease.

A Figura 10 apresenta uma tabela na qual são sumariados os resultados do SDS-PAGE com Tricina. Uma cruz indica a presença no gel da banda correspondente ao fragmento de proteína com 84 aminoácidos de longitude da HMGB1 natural ou da variante polipeptídica de HMGB1 Box-A.

A Fig.11 apresenta a concentração média plasmática/tempo após uma administração subcutânea única de Box-A natural (WT) e variante de Box-A número 64 numa dosagem de 1 mg/kg. Representação dos dados: Média $\pm$ EPM.

A Fig.12 apresenta a concentração média plasmática/tempo após uma administração subcutânea única de Box A natural (WT) e variante de Box A número 64 numa dosagem de 1 mg/kg e de Box A natural PEGilada (PEG-WT) e variante de Box-A PEGilada número 64 (PEG-64) numa dosagem de 5 mg/kg. Representação dos dados: Média $\pm$ EPM.

EXEMPLOS

1. TESTE DE ACTIVIDADE IN VITRO: ENSAIO DE MIGRAÇÃO DE CÉLULAS NIH/373

O objectivo do presente estudo foi o de avaliar a actividade de cada uma das variantes polipeptídicas de HMGB1 Box-A tal como definidas em SEQ ID Nos: 2-116 e comparar a sua actividade com o fragmento de HMGB1 Box-A natural humana de longitude completa de SEQ ID NO:1 de modo a seleccionar todas as variantes com actividade similar ou melhor do que a da natural.

A actividade de HMGB1 Box-A é avaliada *in vitro* como a inibição da migração das células NIH/3T3 induzida por HMGB1.

1.1 Materiais

HMGB1 Box-A natural e variantes (Nautilus Biotech)
células NIH/3T3 (ATCC n. CRL-1658)
meio D-MEM (GIBCO; cat. n. 31966-021)
Soro Bovino Fetal (GIBCO; cat. n. 10270-106)
Penicilina-Estreptomicina 10,000 U/ml (GIBCO; cat. n. 15140-122)
L-Glutamina 200 mM (GIBCO; cat. n. 25030-024)
TrypLE Select (GIBCO; cat. n. 12563-011)
Solução Salina Tamponada com Fosfato (0,138 M NaCl, 0.0027 M KCl, 0.01 M fosfato, pH 7,4)
filtros livres de PVP (tamanho de poro de 8 μ m ; 13 mm de diâmetro total) (Neuro Probe; cat. n. PFA8)
Fibronectina Humana (Roche; cat. n. 1080938)
Câmaras de Quimiotaxia de Poços Cegos (Neuro Probe; cat. n. BW25)
Coloração GIEMSA Modificada (Sigma; cat. n. GS1 L)

1.2 Preparação dos filtros

Os filtros de membrana de polycarbonato livres de PVP (tamanho de poro de 8 μ m, diâmetro total de 13 mm) são preparados cerca de uma hora antes de realizar o ensaio de os revestir com 30 μ l/filtro de uma solução de 50 μ l/ml de

fibronectina distribuída no lado opaco do filtro. A solução mãe de fibronectina é preparada diluindo a fibronectina liofilizada em ddH₂O até uma concentração final de 1 mg/ml e mantendo a solução cerca de 1 hora a 37°C para dissolução completa. Esta solução mãe pode ser armazenada a -20°C. Os filtros são posteriormente deixados a secar sob o fluxo laminar da hotte (cerca de uma hora).

1.3 Preparação das células

Células NIH/3T3 são inoculadas no dia antes do ensaio (aproximadamente 22-24 horas antes de realizar o ensaio) a 10⁶ células/placa.

Quando os filtros estão prontos a ser utilizados, as células são desprendidas com Tripsina, contadas e re-suspendidas a 10⁶ células/ml em meio de cultura livre sem soro.

1.4 Ensaio de quimiotaxia

Em cada ensaio de quimiotaxia são testadas 14 variantes polipeptídicas diferentes de fragmento de longitude completa de HMGB1 Box-A humana de SEQ ID NO:1.

O meio de crescimento celular sem adição de soro (w/o FBS) é utilizado como controlo negativo representando a migração espontânea.

Utiliza-se 1 nM de HMGB1 como controlo positivo. A HMGB1 Box-A natural ou as variantes polipeptídicas testadas a 0,5/1 nM são adicionados a 1nM de HMGB1 para inibir a migração de células NIH/3T3 induzida por HMGB1.

O controlo negativo (w/o FBS) e o controlo positivo são testados em triplicado em cada ensaio.

A actividade de HMGB1 Box-a natural (SEQ ID NO:1) na inibição da migração celular induzida por HMGB1 é testada em triplicado em cada ensaio.

Cada uma das variantes polipeptídicas de HMGB1 Box-A (SEQ ID Nos: 2 a 116) é testada em duplicado.

São utilizadas Câmaras de Quimotaxia de Poços Cegos. O poço inferior seco, limpo de cada câmara é cheio com 50 μ l de DMEM sem adição de FBS com o agente quimiotático e inibidores apropriados. Deverá formar-se um menisco ligeiramente positivo quando o poço é cheio; isto ajuda a evitar que as bolhas de ar fiquem presas quando é aplicado o filtro. Com a ajuda de pequenos fórceps o filtro é colocado sobre o poço cheio (lado tratado com fibronectina para cima), com cuidado para não aprisionar bolhas de ar e não tocar no filtro com os dedos. O retentor do filtro é roscado manualmente. A suspensão celular (50000 células/50 μ l) é pipetada para o poço superior e são adicionados 150 μ l de meio sem soro para encher o poço superior da câmara. A câmara cheia é incubada durante 3 horas (37°C, 5% CO₂) para permitir a migração celular. Após incubação o fluido é removido do filtro. O retentor é desenroscado e é imerso em água destilada. O filtro é levantado com a ajuda de fórceps, colocado numa superfície limpa (parafina sólida) (células migradas para cima) e fixado com uma agulha (colcoada na margem).

1.5 Coloração com GIEMSA das células migradas

Os filtros são fixados uma vez com etanol sendo posteriormente lavados três vezes sob água corrente. É preparada imediatamente antes de utilização, uma solução de trabalho de Corante GIEMSA modificado diluída 1:10 em ddH₂O. Após a lavagem dos filtros, é adicionado o corante e deixado a incubar durante 20 minutos. A lavagem do corante é realizada sob água corrente. Os filtros são posteriormente aplicados em lâminas com o lado das células migradas para baixo, e o lado das células não migradas é cuidadosamente limpo com uma mecha de algodão molhada (limpar duas vezes, utilizando duas mechas ou ambos os lados de uma mecha de ponta dupla) com cuidado para não mover o filtro. Após a limpeza, é colocada uma tampa deslizante no filtro e as células são contadas ao microscópio a 40x em 10 campos/filtro aleatórios.

1.6 Representação de dados e análise estatística

Os resultados do ensaio de migração de células NIH/3T3 realizado são reportados nas tabelas e gráficos de barras apresentados na Figura e Tabela 7.1 a Figura e Tabela 7.9.

Os dados são representados em barras como MEAN $\pm$ 95%Cl.

A análise estatística realizada é a ANOVA de via única seguida do teste posterior de Dunnett (dados da coluna de controlo: amostra 1nM de HMGB1 + amostra de HMGB1 Box-A WT).

Quando se avaliam os dados dos resultados, os dados das variantes de HMGB1 Box-A com um valor de $p < 0,05$ no teste posterior são considerados significativamente diferentes de HMGB1 Box-A natural. Se a média da variante polipeptídica de Box-A for superior do que a da Box-A natural a coluna está colorida a vermelho no gráfico do ensaio apresentado nas Figuras 7.1 a 7.9. Essas colunas a vermelho representam as variantes polipeptídicas de HMGB1 Box-A que apresentam menos actividade do que a natural na inibição da migração induzida por HMGB1.

Se a média da variante polipeptídica resulta menor do que a de Box-A natural então a coluna está colorida em azul claro no gráfico do ensaio apresentado nas Figuras 7.1 a 7.9. Essas variantes representam variantes de HMGB1 Box-A que apresentam actividade superior em relação à HMGB1 Box-A natural na inibição da migração celular induzida por HMGB1.

Os dados das variantes de HMGB1 com um valor de $p > 0,05$ no teste posterior são considerados não significativamente diferentes de HMGB1 Box-A natural. As barras dessas variantes estão coloridas a verde. Essas variantes representam as variantes de HMGB1 que apresentam a mesma actividade da natural na inibição da migração celular induzida por HMGB1.

1.7 Resultados

A actividade das variantes polipeptídicas do domínio de elevada afinidade Box-A da HMGB1 humana de SEQ ID Nos: 2 a 116 foi avaliada em comparação com a HMGB1 Box-A natural humana de SEQ ID NO:1 como a inibição da migração celular induzida por HMGB1, de modo a determinar as variantes polipeptídicas preferidas úteis como fragmento de HMGB1 Box-A do conjugado polimérico preferido do presente invento.

Os resultados dos ensaios de quimiotaxia revelaram (Figuras 7.1 a 7.9) que para 26 variantes polipeptídicas a mutação de acordo com o presente invento poderia conduzir a uma actividade superior na inibição da migração celular em comparação com a actividade da HMGB1 Box-A natural humana. Em particular, foi demonstrada uma actividade superior na inibição da migração celular para as variantes polipeptídicas de SEQ ID Nos: 30-32, 35, 38, 40-41, 43, 48, 51, 57, 63-64, 69, 70, 94, 95, 100, 103-104, 106-107, 109-111 e 113.

Além disso, os resultados dos ensaios de quimiotaxia revelaram (Figuras 7.1 a 7.9) que 41 variantes polipeptídicas não apresentaram modificações na sua actividade de inibição da migração celular induzida por HMGB1 em comparação com a actividade do polipéptido Box-A natural. Em particular, é o caso para as variantes polipeptídicas de SEQ ID Nos: 2, 7, 9, 11, 15, 18, 22, 26-28, 33, 37, 39, 42, 44-47, 49, 52, 55, 59, 61, 62, 66-67, 71, 80-84, 86-87, 97-99, 101-102, 112 e 114.

Todas estas variantes polipeptídicas de Box-A que apresentam uma actividade similar ou superior à da Box-A natural foram testadas em relação à resistência à protease *in vitro*, de modo a seleccionar as mais resistentes que sejam pelo menos tão activas quanto as Box-A naturais (ver teste de resistência à protease no Exemplo 2).

2. TESTE IN VITRO DE RESISTÊNCIA À PROTEASE

O objectivo do presente estudo foi o de avaliar a resistência à protease *in vitro* das variantes da HMGB1 Box-A apresentadas no Exemplo 1 e compará-la com a da HMGB1 Box-A natural de SEQ ID NO:1 de modo a identificar as variantes com

resistência à protease melhorada em relação ao polipéptido natural.

2.1 Materiais

Box-A natural de HMGB1 marcada com His e variantes seleccionadas (Nautilus biotech)

Tripsina (Sigma; cat. n. T8658 ; lot.n. 045K5113)

α -quimotripsina (Sigma; cat. n. C6423; lot.n. 109H74858),

Endoproteinase Asp-N (Sigma; cat. n. P3303; lot.n. 046K1049)

Endoproteinase Glu-C (Sigma; cat. n. P6181 ; lot.n. 075K5100)

Mini cocktail inibidor da protease livre de EDTA completo, (Roche; cat. n. 11836170 001)

Base de Trizma (Sigma; cat. n. T6066)

Solução de Acrilamida/bis 40% em água (Sigma; cat.n. 01709)

SDS (Sigma; cat. n. 71729)

Glicerol 99% (Sigma; cat. n. G9012)

Temed (Sigma; cat. n. 87689)

APS (Sigma; cat. n. A 3678)

Padrões de Peso Molecular de SDS-PAGE de Polipéptido (Bio-Rad; cat. n. 161-0326)

Tampão Pré-misturado 10x Tris/tricina/SDS (Bio-Rad; cat. n. 161-0744)

β -Mercaptoetanol (Sigma; cat. n. M7154)

Metanol (VWR; cat. n. 20864.320)

Ácido Acético (VWR; cat. n. 20104.323)

Azul Brilhante R (Sigma; cat. n. B0149)

Azul de Bromofenol (Sigma; cat. n. B0126)

Ácido clorídrico (Merck; cat. n. 1.00319.2511)

3X amostra de tampão de carga para géis de Tricina (composição: 150 mM Tris-HCl, pH 6,8; 12% SDS; 36% glicerol; 6% β -Mercaptoetanol; 0,04% de azul de bromofenol)

2.2 Preparação da mistura de protease

É utilizada uma mistura de proteases contendo tripsina, α -quimotripsina, endoproteinase Asp-N e endoproteinase Glu-C is used.

A Tabela 1 reporta a especificidade de cada uma das proteases utilizadas neste estudo

Tabela 1: especificidade da protease

Protease	Especificidade
Tripsina	C-terminal de K, R (não se P no C-terminal no sítio de corte; digestão mais lenta se resíduo ácido em qualquer um dos lados do sítio de corte)
α -quimotripsina	C-terminal de T, P, W, L (hidrólise secundária: C-terminal de M, I, S, T, V, H, G, A)
Endoproteinase Asp-N	N-terminal de D, C
Endoproteinase Glu	C-terminal de E, D (não se P estiver no C-terminal do sítio de corte)

Cada protease liofilizada é dissolvida de acordo com as recomendações do fabricante para obter uma solução mãe de que é aliqüotada e armazenada a -80°C .

São dissolvidos 100 μg de tripsina em 100 μl de ddH₂O para obter 1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ de solução mãe. São dissolvidos 25 μg de α -quimotripsina em 50 μl de uma solução de HCl 1mM, CaCl₂ 2 mM para obter uma solução mãe a 0,5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$. São dissolvidos 2 μg de endoproteinase Asp-N em 50 μl de dH₂O para obter uma solução mãe a 0,04 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$. São dissolvidos 25 μg de endoproteinase Glu-C em 50 μl de dH₂O para obter uma solução mãe a 0,5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$.

Antes de realizar o ensaio deixa-se descongelar em gelo uma aliqüota de cada solução mãe de protease.

São diluídas em dH₂O aliqüotas de solução mãe de tripsina e endoproteinase Glu-C para obter uma solução final de trabalho a 0,1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$. A aliqüota de solução mãe de α -quimotripsina é diluída numa solução de HCl 1 mM, CaCl₂ 2 mM para obter uma solução final de trabalho a 0,1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$. A aliqüota de endoproteinase Asp-N é utilizada sem diluição.

Antes de realizar o ensaio é preparada de fresco e imediatamente adicionada à HMGB1 Box-A para ser digerida, uma mistura de proteases contendo 1% (em peso/peso de total de Box-A contida na amostra) de cada protease.

2.3 Digestão por protease de HMGB1 Box-A e variantes

São digeridos um total de 18 μg de cada HMGB1 Box-A (natural ou variantes) em cada ensaio.

A HMGB1 Box-A a ser testada é deixada a descongelar em gelo e é retirado o volume correspondente a 18 μg . O volume desta solução é posteriormente levado com dH₂O a um volume final de 90 μl de forma a obter o mesmo volume final para cada HMGB1 Box-A a ser testada.

São retirados 10 μl desta solução (correspondentes a 2 μg de HMGB1 Box-A) antes de adicionar a mistura de protease. Esta amostra corresponde à amostra não digerida "tempo 0".

A restante amostra (16 μg de HMGB1 Box-A) é adicionada com 8,8 μl (correspondentes a 0,16 de cada protease da mistura preparada de fresco; ver 2.2) de mistura de protease para digestão.

A digestão por protease é realizada a 25°C e é amostrado um volume correspondente a 2 μg de HMGB1 Box-A (originalmente presente na mistura) em pontos no tempo definidos. A digestão é cessada adicionando 4 μl de uma solução de Mini cocktail inibidor da protease livre de EDTA completo (1 comprimido dissolvido em 10 ml de dH₂O).

Os pontos no tempo para amostragem são: 0, 5 minutos, 15 minutos, 30 minutos, 1 hora, 1,5 horas, 2 horas e 4 horas.

Imediatamente após a inibição de protease, as amostras são adicionadas com a quantidade apropriada do tampão de carga 3x e incubadas a 95°C durante cerca de minutos.

2.4 SDS-PAGE com Tricina de HMGB1 Box-A natural e variantes digeridas

Após a digestão por protease e preparação das amostras, as amostras nos pontos no tempo de cada HMGB1 Box-A são colocadas num gel SDS PAGE com Tricina (ver para referências: *Schägger and von Jagow*, "Tricine-sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa", *Anal. Biochem.* 166, 368-379, 1987).

5 μ l de Padrões de Peso Molecular de SDS-PAGE de Polipéptido (Bio-Rad) são colocados para referência em cada gel.

Cada poço do gel é carregado com 10 μ l de amostra (volume correspondente a 1 μ g de HMGB1 Box-a antes de digestão).

Realiza-se electrofore a 20 V até o azul de bromofenol entrar na porção separadora do gel, posteriormente a 120 V (Sistema Mini Protean 3; Bio-Rad) até o final da análise.

Os géis são corados ao serem embebidos em solução corante Coomassie Azul Brilhante R (0,1% p/v em 50% metanol, 10% ácido acético) durante 1 hora e descorados de um dia para o outro em solução descorante (30% metanol, 10% ácido acético).

As imagens do gel são adquiridas com sistema de imagem Gel Doc 2000 (Bio-Rad).

2.5 Resultados

Nas condições do ensaio acima reportado a proteína HMGB1 natural resistiu aproximadamente 30 minutos á digestão por protease completa. Na Figura 8 a banda correspondente ao fragmento com 84 aminoácidos da proteína de longitude completa de HMGB1 Box-A natural humana de SEQ ID NO:1 é visível até aos 30 minutos de digestão por protease.

As 21 variantes polipeptídicas de Box-A testadas apresentaram uma maior resistência à protease (Figura 10). Nas condições descritas do ensaio estas variantes resistiram de 1 hora a 2 horas à digestão por protease. As variantes

polipeptídicas de SEQ ID Nos: 33, 35, 37, 38, 39, 42, 43, 44, 47, 48, 57, 62, 69 e 104 apresentaram uma resistência de 1 hora à digestão por protease. Figuras 9.14, 9.15, 9.16, 9.17, 9.18, 9.21, 9.22, 9.23, 9.26, 9.27, 9.32, 9.35, 9.40 e 9.59 mostram uma banda correspondente à proteína de 84 aminoácidos não marcada com His que é visível até 1 hora de digestão por protease.

As variantes polipeptídicas de SEQ ID Nos: 45, 49, 52, 55 e 67 apresentaram uma resistência de 1,5 horas à digestão por protease. As Figuras 9.24, 9.28, 9.30, 9.31 e 9.39 mostram uma banda correspondente à proteína de 84 aminoácidos não marcada com His que é claramente visível 1 hora e meia após a digestão por protease. As variantes polipeptídicas de SEQ ID Nos: 59 e 64 apresentam mesmo uma resistência até 2 horas à digestão por protease. As Figuras 9.33 e 9.37 mostram uma banda da proteína de 84 aminoácidos não marcada com His que é claramente visível até 2 horas após a digestão por protease.

3. ESTUDO FARMACOCINÉTICO DE BOX A (NATURAL E VARIANTES) E BOX A PEGILADA (NATURAL E VARIANTES) APÓS ADMINISTRAÇÃO ÚNICA SUBCUTÂNEA EM RATINHOS.

3.1 Objectivo do estudo

O objectivo do estudo foi o de avaliar e comparar o perfil farmacocinético de Box A (natural e variantes) e Box A PEGilada (natural e variantes) a seguir a uma administração única subcutânea dos compostos em ratinhos.

3.2 Materiais e métodos

Artigos teste: Box A ntural e variantes e as correspondentes moléculas PEGiladas. As moléculas PEGiladas foram obtidas fazendo reagir mPEG-aldeído linear (40 kDa) com o N-terminal da respectiva molécula de Box A através de aminação reductiva.

3.3 Ensaio in vivo

Animais: ratinhos (Balb/c, machos, 7-9 semanas de idade, fornecidos por Charles River Laboratories Italia SpA, Calco uma semana antes do ensaio) com um peso corporal médio de 22,2-22,4 g no momento do ensaio.

Manuseamento dos animais: os animais foram alojados em contentor ventilado termostático regulado para manter a temperatura e humidade relativa a $22^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ e $55 \pm 15\%$, respectivamente, com ciclo de 12 horas luz/escurecimento. Os ratinhos foram alojados até 10 numa jaula, em jaulas de policarbonato transparentes (Techniplast, Buguggiate, Itália); foram fornecidos *ad libitum* água para beber através de garrafas de água e uma dieta para roedores de laboratório comercialmente disponíveis (4RF21, Mucedola s.r.l., Settimo Milanese, Itália).

Grupos experimentais: 4 (quatro elementos teste), 20 animais/grupo, agrupados aleatoriamente.

Dose administrada: Box A natural e variantes foram administradas a 1 mg/kg por via subcutânea. Box A natural PEGilada e variantes foram administradas a 5 mg/kg por via subcutânea. Estas doses asseguraram equimolaridade dos compostos teste.

Administração dos elementos teste: os elementos teste foram administrados por via subcutânea usando uma seringa de insulina equipada com uma agulha de 0,45 x 12 mm (26G x ½") a um volume de 0,25 mL/ratinho (10 mL/kg peso corporal).

Formulação do artigo teste: Solução Salina de Tampão Fosfato

Sacrifício dos animais e recolha de sangue:

As amostras de sangue foram recolhidas nos seguintes pontos no tempo após tratamento:

- Box A natural e variantes: 5, 20 e 40 minutos, 1,5 e 2,5 horas após a administração dos compostos teste;

- Box A natural PEGilada e variantes: 5, 40 minutos, 1,5, 5 e 10 horas após a administração dos compostos teste.

Foram decididos diferentes pontos no tempo para a recolha de amostras de sangue entre os compostos teste na base de uma maior permanência expectável das moléculas PEGiladas no corrente sanguínea.

A cada tempo de amostragem, foram recolhidas amostras de 0,4 mL de sangue da aorta ventral de cada animal usando uma seringa de insulina, sob profunda anestesia com éter, e transferidas para tubos ed Eppendorf de polietileno contendo 5 μ L de heparina (5000 UI/mL) para evitar a coagulação do sangue. As amostras de sangue foram mantidas em gelo até centrifugação a 1400 g durante 5 min. Numa centrífuga refrigerada (2-4°C). De cada tubo foram recuperadas amostras de plasma, colocadas em tubos de Eppendorf e foram congeladas a -80°C até à análise.

3.4 Determinação analítica

As concentrações plasmáticas de Box A (natural e variantes) e Box A PEGilada (natural e variantes) foram determinadas em plasma de rato através de um método ELISA.

Resumidamente, foi preparada uma solução de revestimento diluindo um anticorpo monoclonal contra o N-terminal de Box A para 10 ng/ml em 100 mM de tampão de revestimento carbonato-bicarbonato. Foram alíquotados 100 μ L de todos os poços de uma placa ELISA Nunc Maxisorp, a qual foi incubada durante a noite a 4°C. A placa foi lavada com Tween 0,05% em PBS 6 vezes e foram adicionados 300 μ L de 5% de leite em PBS com 1% Tween a cada poço para bloquear os restantes pontos de união na placa. A placa foi incubada durante 1 hora à temperatura ambiente a 300 rpm. As amostras foram diluídas 1:20 em PBS com 1% de Tween.

A placa foi lavada 6 vezes e 100 μ L de padrões e amostras diluídas foram transferidos para os poços designados da placa revestida e incubada á temperatura ambiente durante

1 hora a 300 rpm. A placa foi novamente lavada 6 vezes antes da adição do anticorpo secundário contra o C-Terminal de Box A (1:200). Após 1 hora de incubação e 6 lavagens, a solução 1:20000 de conjugado de biotina-cabra anti-coelho foi adicionada a todos os poços (100 μ L/poço). Após 1 hora de incubação (à temperatura ambiente, 300 rpm) e seis lavagens, a placa foi incubada com 100 μ L/poço de solução de estreptavidina-HRP 1:100000 durante 25 minutos a 300 rpm. A placa foi lavada 6 vezes e foram adicionados 100 μ L de substrato TMB pré-aquecido a cada poço. O sinal foi revelado à temperatura ambiente na bancada e, após 30 minutos, foram adicionados 100 μ L/poço de Solução Stop e a placa foi imediatamente lida a 450 nm.

3.5 Resultados

As concentrações médias plasmáticas de Box A (natural e variantes) e Box A PEGilada (natural e variantes) foram calculadas para cada uma das amostras de PK previamente descritas e o perfil farmacocinético foi determinado. Os resultados são apresentados na Fig.11 e 12.

Como exemplo, são aqui reportados adiante os perfis de PK de Box A natural e variante n. 64 (M511). Os resultados são reportados sob a forma de valores média $\pm$ erro (EPM) (4 ratinhos para ponto no tempo, análises em duplicado).

Na tabela seguinte, são reportada as curvas de AUC_{última} (Área Sob a Curva calculada no último ponto experimental) para Box A natural, Box A variante número 64, Box A PEGilada natural e Box A PEGilada variante número 64.

Tabela 2. Dados calculados das curvas $AUC_{\text{última}}$ para Box A natural (WT), Box A variante número 64 (64), Box A PEGilada natural (WT) e variante número 64 de Box A PEGilada natural (PEG-64).

	$AUC_{\text{última}}$ ($\mu\text{M} \cdot \text{min}$)
WT	8,899
64	14,97
PEG-WT	275,5
PEG-64	332,5

3.6 Discussão

O ganho relativo em $AUC_{\text{última}}$ conferido pela mutação é de 1,68x (WT vs. 64), muito provavelmente devido a uma maior resistência à protease no compartimento *sub cute*. O ganho relativo em $AUC_{\text{última}}$ conferido à WT por PEGilação é 31x (WT vs. PEG-WT), principalmente devido à debilitada filtração renal do conjugado de PEG, mas também para protecção da acção da protease. Colocando em conjunto mutação e PEGilação proporcionam um ganho relativo na $AUC_{\text{última}}$ de 37x (WT vs. PEG-64). Inesperadamente, as duas modificações em conjunto têm um efeito positivo na exposição do animal à proteína que é superior à soma das contribuições das modificações isoladas (ou seja, $37x > 1,68x + 31x$). Deste modo, uma mutação pontual única e PEGilação possuem um efeito sinérgico cooperativo no perfil farmacocinético a proteína nativa. Uma explicação possível deste fenómeno pode ser de que as proteínas PEGiladas não estão completamente protegidas da proteólise no compartimento *sub cute*. A introdução de uma mutação pontual única confere um impulso à resistência nestes compartimento, permitindo que quantidades maiores de proteína entrem na circulação sanguínea e para serem posteriormente protegidas da filtração renal pela volumosa cadeia PEG.

Lisboa, 2011-06-30

REIVINDICAÇÕES

1. Conjugado polimérico do domínio de união de elevada afinidade de Box-A de HMGB1 natural humano e/ou não humano (HMGB1 Box-A) ou de um fragmento biologicamente activo de HMGB1 Box-A.

2. Conjugado polimérico de uma variante polipeptídica do domínio de união de elevada afinidade Box-a de HMGB1 humano e/ou não humano (HMGB1 Box-A) ou de um fragmento biologicamente activo de HMGB1 Box-A, em que a sequência de aminoácidos da variante polipeptídica difere da sequência de aminoácidos da HMGB1 Box-A natural pela mutação de um ou mais aminoácidos individuais.

3. Conjugado polimérico da reivindicação 1 ou 2, em que o polímero é um fragmento polimérico linear ou ramificado do grupo que consiste em polialquileno glicol, óxido de polialquileno, ácido poliacrílico, poliácrlato, poliácrlamida ou seus derivados N-alquilo, ácido polimetacrílico, polimetacrilato, ácido polietilacrílico, polietilacrilato, polivinilpirrolidina, poli(álcool vinílico), ácido poliglicólico, ácido poliláctico, ácido poli(láctico-co-glicólico), dextrano, quitosana ou poliaminoácido.

4. Conjugado polimérico da reivindicação 1 ou 2, em que o polímero é um fragmento polimérico linear ou ramificado seleccionado a partir de poietileno glicol (PEG) ou metoxi-polietileno glicol (m-PEG), preferencialmente com um peso molecular médio de 20.000 ou um peso molecular médio de 40.000 Da.

5. Conjugado polimérico de qualquer uma das reivindicações 1 a 4, em que o fragmento polimérico se encontra ligado de modo covalente ao polipéptido HMGB1 Box-A, variante de polipéptido HMGB1 Box-A ou fragmento biologicamente activo do mesmo.

6. Conjugado polimérico de qualquer uma das reivindicações 1 a 5, em que o ponto de conjugação no polipéptido HMGB1 Box-A, variante polipeptídica ou fragmento

biologicamente activo do mesmo é seleccionado a partir de um resíduo lisina, cisteína, histidina, arginina, tirosina, serina, treonina, aspartato e glutamato ou o grupo N-terminal.

7. Conjugado polimérico de qualquer uma das reivindicações 1 a 6, em que a variante polipeptídica difere da difere da sequência de HMGB1 Box-a natural pela mutação de 1 a 10 aminoácidos individuais, preferencialmente somente por um aminoácido individual.

8. Conjugado polimérico da reivindicação 7, em que a mutação é uma substituição, uma eliminação ou uma adição de aminoácidos individuais.

9. Conjugado polimérico da reivindicação 8, em que a substituição é uma substituição conservadora ou não conservadora obtida através de um aminoácido geneticamente codificado diferente ou por aminoácidos não geneticamente modificados.

10. Conjugado polimérico de qualquer uma das reivindicações 1 a 9, em que a variante polipeptídica da HMGB1 Box-A humana é seleccionada a partir do grupo que consiste em sequências de aminoácidos tal como definidas em qualquer uma das SEQ ID NO:2 a 116.

11. Conjugado polimérico de qualquer uma das reivindicações 1 a 9, em que os fragmentos biologicamente activos da HMGB1 Box-A natural humana é um fragmento de pelo menos 77 ou pelo menos 54 aminoácidos respectivamente e compreende as sequências de aminoácidos tal como definidas em SEQ ID NO: 117 ou 223 respectivamente e em que a variante polipeptídica dos referidos fragmentos biologicamente activos da HMGB1 Box-A humana é seleccionada a partir do grupo que consiste nas sequências de aminoácidos tal como definidas em qualquer das SEQ ID NO: 118 a 22 ou 224 a 300.

12. Conjugado polimérico de qualquer uma das reivindicações 1 a 9, em que a HMGB1 Box-A não humana é HMGB1 Box-A de *Anopheles gambia* (SEQ ID NO: 301) e em que a variante polipeptídica não humana da referida HMGB1 Box-A de

Anopheles gambia é seleccionada a partir do grupo que consiste nas sequências de aminoácidos tal como definidas em qualquer uma de SEQ ID NO: 302 a 418.

13. Conjugado polimérico de qualquer uma das reivindicações 1 a 9 e 12, em que os fragmentos biologicamente activos da HMGB1 Box-A natural de *Anopheles gambia* é um fragmento de pelo menos 77 ou pelo menos 54 aminoácidos respectivamente e compreende as sequências de aminoácidos tal como definidas em SEQ ID NO:419 ou 529 respectivamente e em que a variante polipeptídica dos referidos fragmentos biologicamente activos da HMGB1 Box-A de *Anopheles gambia* é seleccionada a partir do grupo que consiste nas sequências de aminoácidos tal como definidas em SEQ ID NO: 420 a 528 ou 530 a 610.

14. Composição farmacêutica compreendendo uma quantidade eficaz de pelo menos um conjugado polimérico de qualquer uma das reivindicações anteriores como agente activo e opcionalmente em conjunto com suportes, adjuvantes, diluentes e/ou aditivos farmacêuticamente aceitáveis.

15. Composição da reivindicação 14 para aplicações de diagnóstico ou para aplicações terapêuticas.

16. Uso de um conjugado polimérico de qualquer uma das reivindicações 1 a 13 no fabrico de um medicamento para a prevenção, alívio ou tratamento de patologias associadas com HMGB1 ou patologias associadas com as proteínas homólogas a HMGB1, particularmente seleccionadas de estados patológicos mediados pela activação da cascata de citocina inflamatória.

17. Uso da reivindicação 16, em que os estados patológicos são seleccionados a partir do grupo que consiste em doença inflamatória, doença autoimune, síndrome de resposta inflamatória sistémica, lesão de reperfusão após transplante de órgão, alterações cardiovasculares, doença obstétrica e ginecológica, doença infecciosa (viral e bacteriana), doença alérgica e atópica, patologias de tumores sólidos e não sólidos, doenças de rejeição de transplantes, doenças congénitas, doenças dermatológicas, doenças neurológicas, caquexia, doenças renais, estados de

intoxicação iatrogénica, doenças metabólicas e idiopáticas e doenças oftalmológicas.

18. Uso de um conjugado polimérico de qualquer uma das reivindicações 1 a 13 no fabrico de um medicamento para a prevenção, alívio ou tratamento de patologias relacionadas com RAGE, em particular diabetes do tipo I e/ou tipo II.

19. Uso de qualquer uma das reivindicações 16 a 18 em combinação com um outro agente capaz de inibir um mediador precoce da cascata de citocina inflamatória, em que o outro agente é particularmente seleccionado de

(i) um antagonista ou inibidor de uma citocina seleccionado a partir do grupo que consiste em TNF, IL-1 α , IL-1 β , IL-Ra, IL-6, IL-8, IL-10, IL-13, IL-18, IFN- γ MIP-1 α , MIF-1 β , MIP-2, MIF e PAF;

(ii) um anticorpo direccionado a RAGE, um ácido nucleico ou análogo de ácido nucleico capaz de inibir a expressão de RAGE, por exemplo, uma molécula antisense, uma ribozima ou uma molécula de interferência de ARN, ou uma pequena molécula sintética antagonista da interacção de HMGB1 com RAGE ou RAGE solúvel (sRAGE);

(iii) um inibidor da interacção de um receptor tipo Toll (TLR), em particular de TLR2, TLR4, TLR7, TLR8 e/ou TLR9, com HMGB1, preferencialmente um anticorpo monoclonal ou policlonal, um ácido nucleico ou análogo de ácido nucleico capaz de inibir a expressão de TLR, por exemplo, uma molécula antisense, uma ribozima ou uma molécula de interferência de ARN, ou uma molécula sintética com uma dimensão inferior a 1000 Dalton.

20. Composição da reivindicação 14 em que o conjugado polimérico está em combinação com pelo menos um outro agente tal como definido na reivindicação 19.

21. Dispositivo médico revestido de modo reversível com pelo menos um conjugado polimérico de qualquer uma das reivindicações 1 a 13.

Lisboa, 2011-06-30

Figura 1a

84 aminoácidos de Box A

Protecção contra proteólise
Se a sequência:

GKGDPPKKPRGKMSSYAFFVQTCREEHKKKHPDASVNFSEFSKKCSERWKTMSAKE
KGKFEDMAKADKARYEREMKTYIPPKGET

A negrito aminoácidos sensíveis a proteólise por proteases

Figura 1b

84 aminoácidos de Box A

Lista de mutantes:

K2N	K27Q	E55Q	E73N
K2Q	K28N	E55H	M74I
D4N	K28Q	E55N	M74V
D4Q	K29N	K56N	K75N
P5A	K29Q	K56Q	K75Q
P5S	P31A	K58N	Y77H
K6N	P31S	K58Q	Y77I
K6Q	D32N	F59I	P79A
K7N	D32Q	F59V	P79S
K7Q	F37I	E60Q	P80A
P8A	F37V	E60H	P80S
P8S	E39Q	E60N	K81N
R9H	E39H	D61N	K81Q
R9Q	E39N	D61Q	E83Q
K11N	F40I	M62I	E83H
K11Q	F40V	M62V	E83N
M12I	K42N	K64N	
M12V	K42Q	K64Q	
Y15H	K43N	D66N	
Y15I	K43Q	D66Q	
F17I	E46Q	K67N	
F17V	E46H	K67Q	
F18I	E46N	R69H	
F18V	R47H	R69Q	
R23H	R47Q	Y70H	
R23Q	W48Y	Y70I	
E24Q	W48S	E71Q	
E24H	K49N	E71H	
E24N	K49Q	E71N	
E25Q	M51I	R72H	
E25H	M51V	R72Q	
E25N	K54N	E73Q	
K27N	K54Q	E73H	

Continuação da figura 1b

Sequências de 84 aminoácidos de Box A:

> sequência 1 Natural

**GKGDPKKPRGKMSSYAFFVQTCREEHKKKHPDASVNFSEFSKKCSERWKTMSAKEKGKFEDMAKAD
KARYEREMKTYIPPKGET**

> sequência 2 K2N

**GNGDPKKPRGKMSSYAFFVQTCREEHKKKHPDASVNFSEFSKKCSERWKTMSAKEKGKFEDMAKAD
KARYEREMKTYIPPKGET**

> sequência 3 K2Q

**GQGDPPKPRGKMSSYAFFVQTCREEHKKKHPDASVNFSEFSKKCSERWKTMSAKEKGKFEDMAKAD
KARYEREMKTYIPPKGET**

> sequência 4 D4N

**GKGNPKKPRGKMSSYAFFVQTCREEHKKKHPDASVNFSEFSKKCSERWKTMSAKEKGKFEDMAKAD
KARYEREMKTYIPPKGET**

> sequência 5 D4Q

**GKGQPKKPRGKMSSYAFFVQTCREEHKKKHPDASVNFSEFSKKCSERWKTMSAKEKGKFEDMAKAD
KARYEREMKTYIPPKGET**

> sequência 6 P5A

**GKGDAKKPRGKMSSYAFFVQTCREEHKKKHPDASVNFSEFSKKCSERWKTMSAKEKGKFEDMAKAD
KARYEREMKTYIPPKGET**

> sequência 7 P5S

**GKGDSKKPRGKMSSYAFFVQTCREEHKKKHPDASVNFSEFSKKCSERWKTMSAKEKGKFEDMAKAD
KARYEREMKTYIPPKGET**

> sequência 8 K6N

**GKGDPNKPRGKMSSYAFFVQTCREEHKKKHPDASVNFSEFSKKCSERWKTMSAKEKGKFEDMAKAD
KARYEREMKTYIPPKGET**

> sequência 9 K6Q

**GKGDPQKPRGKMSSYAFFVQTCREEHKKKHPDASVNFSEFSKKCSERWKTMSAKEKGKFEDMAKAD
KARYEREMKTYIPPKGET**

> sequência 10 K7N

**GKGDPKNPRGKMSSYAFFVQTCREEHKKKHPDASVNFSEFSKKCSERWKTMSAKEKGKFEDMAKAD
KARYEREMKTYIPPKGET**

> sequência 11 K7Q

**GKGDPKQPRGKMSSYAFFVQTCREEHKKKHPDASVNFSEFSKKCSERWKTMSAKEKGKFEDMAKAD
KARYEREMKTYIPPKGET**

> sequência 12 P8A

**GKGDPKKARGKMSSYAFFVQTCREEHKKKHPDASVNFSEFSKKCSERWKTMSAKEKGKFEDMAKAD
KARYEREMKTYIPPKGET**

> sequência 13 P8S

GKGDPKKSARGKMSSYAFFVQTCREEHKKKHPDASVNFSEFSKKCSERWKTMSAKE

Continuação da figura 1b

KGKFEDMAKADKARYEREMKTYIPPKGET

> sequência 14 R9H

**GKGDPKKPHGKMSSYAFFVQTCREEHKKKHPDASVNFSEFSKKCSERWKTMSAKEKGKFEDMAKAD
KARYEREMKTYIPPKGET**

> sequência 15 R9Q

**GKGDPKKPQGKMSSYAFFVQTCREEHKKKHPDASVNFSEFSKKCSERWKTMSAKEKGKFEDMAKAD
KARYEREMKTYIPPKGET**

> sequência 16 K11N

**GKGDPKKPRGNMSSYAFFVQTCREEHKKKHPDASVNFSEFSKKCSERWKTMSAKEKGKFEDMAKAD
KARYEREMKTYIPPKGET**

> sequência 17 K11Q

**GKGDPKKPRGQMSSYAFFVQTCREEHKKKHPDASVNFSEFSKKCSERWKTMSAKEKGKFEDMAKAD
KARYEREMKTYIPPKGET**

> sequência 18 M12I

**GKGDPKKPRGKISSYAFFVQTCREEHKKKHPDASVNFSEFSKKCSERWKTMSAKEKGKFEDMAKADK
ARYEREMKTYIPPKGET**

> sequência 19 M12V

**GKGDPKKPRGKVSSYAFFVQTCREEHKKKHPDASVNFSEFSKKCSERWKTMSAKEKGKFEDMAKADK
ARYEREMKTYIPPKGET**

> sequência 20 Y15H

**GKGDPKKPRGKMSSHAFFVQTCREEHKKKHPDASVNFSEFSKKCSERWKTMSAKEKGKFEDMAKAD
KARYEREMKTYIPPKGET**

> sequência 21 Y15I

**GKGDPKKPRGKMSSIAFFVQTCREEHKKKHPDASVNFSEFSKKCSERWKTMSAKEKGKFEDMAKADK
ARYEREMKTYIPPKGET**

> sequência 22 F17I

**GKGDPKKPRGKMSSYAIFVQTCREEHKKKHPDASVNFSEFSKKCSERWKTMSAKEKGKFEDMAKADK
ARYEREMKTYIPPKGET**

> sequência 23 F17V

**GKGDPKKPRGKMSSYAVFVQTCREEHKKKHPDASVNFSEFSKKCSERWKTMSAKEKGKFEDMAKAD
KARYEREMKTYIPPKGET**

> sequência 24 F18I

**GKGDPKKPRGKMSSYAFIVQTCREEHKKKHPDASVNFSEFSKKCSERWKTMSAKEKGKFEDMAKADK
ARYEREMKTYIPPKGET**

> sequência 25 F18V

**GKGDPKKPRGKMSSYAFVVQTCREEHKKKHPDASVNFSEFSKKCSERWKTMSAKEKGKFEDMAKAD
KARYEREMKTYIPPKGET**

> sequência 26 R23H

**GKGDPKKPRGKMSSYAFFVQTCHEEHKKKHPDASVNFSEFSKKCSERWKTMSAKEKGKFEDMAKAD
KARYEREMKTYIPPKGET**

Continuação da figura 1b

> sequência 27 R23Q

GKGDPPKKPRGKMSSYAFFVQTCQEEHKKKHPDASVNFSEFSKKCSERWKTMSAKEKGKFEDMAKADK
AYEREMKTYIPPKGET

> sequência 28 E24Q

GKGDPPKKPRGKMSSYAFFVQTCRQEHKKKHPDASVNFSEFSKKCSERWKTMSAKEKGKFEDMAKAD
KARYEREMKTYIPPKGET

> sequência 29 E24H

GKGDPPKKPRGKMSSYAFFVQTCRHEHKKKHPDASVNFSEFSKKCSERWKTMSAKEKGKFEDMAKAD
KARYEREMKTYIPPKGET

> sequência 30 E24N

GKGDPPKKPRGKMSSYAFFVQTCRNEHKKKHPDASVNFSEFSKKCSERWKTMSAKEKGKFEDMAKAD
KARYEREMKTYIPPKGET

> sequência 31 E25Q

GKGDPPKKPRGKMSSYAFFVQTCREQHKKKHPDASVNFSEFSKKCSERWKTMSAKEKGKFEDMAKAD
KARYEREMKTYIPPKGET

> sequência 32 E25H

GKGDPPKKPRGKMSSYAFFVQTCREHHKKKHPDASVNFSEFSKKCSERWKTMSAKEKGKFEDMAKAD
KARYEREMKTYIPPKGET

> sequência 33 E25N

GKGDPPKKPRGKMSSYAFFVQTCRENHKKKHPDASVNFSEFSKKCSERWKTMSAKEKGKFEDMAKAD
KARYEREMKTYIPPKGET

> sequência 34 K27N

GKGDPPKKPRGKMSSYAFFVQTCREEHNKKHPDASVNFSEFSKKCSERWKTMSAKEKGKFEDMAKAD
KARYEREMKTYIPPKGET

> sequência 35 K27Q

GKGDPPKKPRGKMSSYAFFVQTCREEHQKKHPDASVNFSEFSKKCSERWKTMSAKEKGKFEDMAKAD
KARYEREMKTYIPPKGET

> sequência 36 K28N

GKGDPPKKPRGKMSSYAFFVQTCREEHKNKHPDASVNFSEFSKKCSERWKTMSAKEKGKFEDMAKAD
KARYEREMKTYIPPKGET

> sequência 37 K28Q

GKGDPPKKPRGKMSSYAFFVQTCREEHQKHPDASVNFSEFSKKCSERWKTMSAKEKGKFEDMAKAD
KARYEREMKTYIPPKGET

> ! sequência 38 K29N

GKGDPPKKPRGKMSSYAFFVQTCREEHKKNHHPDASVNFSEFSKKCSERWKTMSAKEKGKFEDMAKAD
KARYEREMKTYIPPKGET

> ! sequência 39 K29Q

GKGDPPKKPRGKMSSYAFFVQTCREEHKKQHPDASVNFSEFSKKCSERWKTMSAKEKGKFEDMAKAD
KARYEREMKTYIPPKGET

Continuação da figura 1b

- > sequência 40 P31A
GKGDPKKPRGKMSSYAFFVQTCREEHKKKHADASVNFSEFSKKCSERWKTMSAKEKGKFEDMAKAD
KARYEREMKTYIPPKGET
- > sequência 41 P31S
GKGDPKKPRGKMSSYAFFVQTCREEHKKKHSDASVNFSEFSKKCSERWKTMSAKEKGKFEDMAKAD
KARYEREMKTYIPPKGET
- > sequência 42 D32N
GKGDPKKPRGKMSSYAFFVQTCREEHKKKHHPNASVNFSEFSKKCSERWKTMSAKEKGKFEDMAKAD
KARYEREMKTYIPPKGET
- > sequência 43 D32Q
GKGDPKKPRGKMSSYAFFVQTCREEHKKKHHPQASVNFSEFSKKCSERWKTMSAKEKGKFEDMAKAD
KARYEREMKTYIPPKGET
- > sequência 44 F37I
GKGDPKKPRGKMSSYAFFVQTCREEHKKKHDPASVNISEFSKKCSERWKTMSAKEKGKFEDMAKADK
ARYEREMKTYIPPKGET
- > sequência 45 F37V
GKGDPKKPRGKMSSYAFFVQTCREEHKKKHDPASVNVSEFSKKCSERWKTMSAKEKGKFEDMAKAD
KARYEREMKTYIPPKGET
- > sequência 46 E39Q
GKGDPKKPRGKMSSYAFFVQTCREEHKKKHDPASVNFSEQFSKKCSERWKTMSAKEKGKFEDMAKAD
KARYEREMKTYIPPKGET
- > sequência 47 E39H
GKGDPKKPRGKMSSYAFFVQTCREEHKKKHDPASVNFSEFSKKCSERWKTMSAKEKGKFEDMAKAD
KARYEREMKTYIPPKGET
- > sequência 48 E39N
GKGDPKKPRGKMSSYAFFVQTCREEHKKKHDPASVNFSEFSKKCSERWKTMSAKEKGKFEDMAKAD
KARYEREMKTYIPPKGET
- > sequência 49 F40I
GKGDPKKPRGKMSSYAFFVQTCREEHKKKHDPASVNFSEISKCSERWKTMSAKEKGKFEDMAKADK
ARYEREMKTYIPPKGET
- > sequência 50 F40V
GKGDPKKPRGKMSSYAFFVQTCREEHKKKHDPASVNFSEVSKCSERWKTMSAKEKGKFEDMAKAD
KARYEREMKTYIPPKGET
- > sequência 51 K42N
GKGDPKKPRGKMSSYAFFVQTCREEHKKKHDPASVNFSEFSNKC SERWKTMSAKEKGKFEDMAKAD
KARYEREMKTYIPPKGET
- > sequência 52 K42Q
GKGDPKKPRGKMSSYAFFVQTCREEHKKKHDPASVNFSEFSQKCSERWKTMSAKEKGKFEDMAKAD
KARYEREMKTYIPPKGET
- > sequência 53 K43N
GKGDPKKPRGKMSSYAFFVQTCREEHKKKHDPASVNFSEFSKNC SERWKTMSAKEKGKFEDMAKAD
KARYEREMKTYIPPKGET

Continuação da figura 1b

- > sequência **54 K43Q**
GKGDPPKKPRGKMSSYAFFVQTCREEHKKKHPDASVNFSEFSKQCSERWKTMSAKEKGKFEDMAKAD
KARYEREMKTYIPPKGET
- > sequência **55 E46Q**
GKGDPPKKPRGKMSSYAFFVQTCREEHKKKHPDASVNFSEFSKKCSQRWKTMSAKEKGKFEDMAKAD
KARYEREMKTYIPPKGET
- > sequência **56 E46H**
GKGDPPKKPRGKMSSYAFFVQTCREEHKKKHPDASVNFSEFSKKCSHRWKTMSAKEKGKFEDMAKAD
KARYEREMKTYIPPKGET
- > sequência **57 E46N**
GKGDPPKKPRGKMSSYAFFVQTCREEHKKKHPDASVNFSEFSKKCSNRWKTMSAKEKGKFEDMAKAD
KARYEREMKTYIPPKGET
- > sequência **58 R47H**
GKGDPPKKPRGKMSSYAFFVQTCREEHKKKHPDASVNFSEFSKKCSEHWKTMSAKEKGKFEDMAKAD
KARYEREMKTYIPPKGET
- > sequência **59 R47Q**
GKGDPPKKPRGKMSSYAFFVQTCREEHKKKHPDASVNFSEFSKKCSEQWKTMSAKEKGKFEDMAKAD
KARYEREMKTYIPPKGET
- > sequência **60 W48Y**
GKGDPPKKPRGKMSSYAFFVQTCREEHKKKHPDASVNFSEFSKKCSERYKTMSAKEKGKFEDMAKADK
ARYEREMKTYIPPKGET
- > sequência **61 W48S**
GKGDPPKKPRGKMSSYAFFVQTCREEHKKKHPDASVNFSEFSKKCSERSKTMSAKEKGKFEDMAKADK
ARYEREMKTYIPPKGET
- > sequência **62 K49N**
GKGDPPKKPRGKMSSYAFFVQTCREEHKKKHPDASVNFSEFSKKCSERWNTMSAKEKGKFEDMAKAD
KARYEREMKTYIPPKGET
- > sequência **63 K49Q**
GKGDPPKKPRGKMSSYAFFVQTCREEHKKKHPDASVNFSEFSKKCSERWQTMSAKEKGKFEDMAKAD
KARYEREMKTYIPPKGET
- > sequência **64 M51I**
GKGDPPKKPRGKMSSYAFFVQTCREEHKKKHPDASVNFSEFSKKCSERWKTISAKEKGKFEDMAKADK
ARYEREMKTYIPPKGET
- > sequência **65 M51V**
GKGDPPKKPRGKMSSYAFFVQTCREEHKKKHPDASVNFSEFSKKCSERWKTVSAKEKGKFEDMAKADK
ARYEREMKTYIPPKGET
- > sequência **66 K54N**
GKGDPPKKPRGKMSSYAFFVQTCREEHKKKHPDASVNFSEFSKKCSERWKTMSANEKGKFEDMAKAD
KARYEREMKTYIPPKGET
- > sequência **67 K54Q**
GKGDPPKKPRGKMSSYAFFVQTCREEHKKKHPDASVNFSEFSKKCSERWKTMSAQEKGKFEDMAKAD

Continuação da figura 1b

KARYEREMKTYIPPKGET> sequência **68 E55Q****GKGDPKKPRGKMSSYAFFVQTCREEHKKKHPDASVNFSEFSKKCSERWKTMSAKQKGKFEDMAKAD
KARYEREMKTYIPPKGET**> sequência **69 E55H****GKGDPKKPRGKMSSYAFFVQTCREEHKKKHPDASVNFSEFSKKCSERWKTMSAKHKGKFEDMAKAD
KARYEREMKTYIPPKGET**> sequência **70 E55N****GKGDPKKPRGKMSSYAFFVQTCREEHKKKHPDASVNFSEFSKKCSERWKTMSAKNKGKFEDMAKAD
KARYEREMKTYIPPKGET**> sequência **71 K56N****GKGDPKKPRGKMSSYAFFVQTCREEHKKKHPDASVNFSEFSKKCSERWKTMSAKENGKFEDMAKAD
KARYEREMKTYIPPKGET**> sequência **72 K56Q****GKGDPKKPRGKMSSYAFFVQTCREEHKKKHPDASVNFSEFSKKCSERWKTMSAKEQGKFEDMAKAD
KARYEREMKTYIPPKGET**> sequência **73 K58N****GKGDPKKPRGKMSSYAFFVQTCREEHKKKHPDASVNFSEFSKKCSERWKTMSAKEKGNFEDMAKAD
KARYEREMKTYIPPKGET**> sequência **74 K58Q****GKGDPKKPRGKMSSYAFFVQTCREEHKKKHPDASVNFSEFSKKCSERWKTMSAKEKGQFEDMAKAD
KARYEREMKTYIPPKGET**> sequência **75 F59I****GKGDPKKPRGKMSSYAFFVQTCREEHKKKHPDASVNFSEFSKKCSERWKTMSAKEKGKIEDMAKADK
ARYEREMKTYIPPKGET**> sequência **76 F59V****GKGDPKKPRGKMSSYAFFVQTCREEHKKKHPDASVNFSEFSKKCSERWKTMSAKEKGKVEDMAKAD
KARYEREMKTYIPPKGET**> sequência **77 E60Q****GKGDPKKPRGKMSSYAFFVQTCREEHKKKHPDASVNFSEFSKKCSERWKTMSAKEKGKFQDMAKAD
KARYEREMKTYIPPKGET**> sequência **78 E60H****GKGDPKKPRGKMSSYAFFVQTCREEHKKKHPDASVNFSEFSKKCSERWKTMSAKEKGKFHDMAKAD
KARYEREMKTYIPPKGET**> sequência **79 E60N****GKGDPKKPRGKMSSYAFFVQTCREEHKKKHPDASVNFSEFSKKCSERWKTMSAKEKGKFNDMAKAD
KARYEREMKTYIPPKGET**> sequência **80 D61N****GKGDPKKPRGKMSSYAFFVQTCREEHKKKHPDASVNFSEFSKKCSERWKTMSAKEKGKFENMAKAD
KARYEREMKTYIPPKGET**> sequência **81 D61Q**

Continuação da figura 1b

**GKGDPKKPRGKMSSYAFFVQTCREEHKKKHPDASVNFSEFSKKCSERWKTMSAKEKGKFEQMAKAD
KARYEREMKTYIPPKGET**

> sequência **82 M62I**

**GKGDPKKPRGKMSSYAFFVQTCREEHKKKHPDASVNFSEFSKKCSERWKTMSAKEKGKFEDIAKADK
ARYEREMKTYIPPKGET**

> sequência **83 M62V**

**GKGDPKKPRGKMSSYAFFVQTCREEHKKKHPDASVNFSEFSKKCSERWKTMSAKEKGKFEDVAKADK
ARYEREMKTYIPPKGET**

> sequência **84 K64N**

**GKGDPKKPRGKMSSYAFFVQTCREEHKKKHPDASVNFSEFSKKCSERWKTMSAKEKGKFEDMANAD
KARYEREMKTYIPPKGET**

> sequência **85 K64Q**

**GKGDPKKPRGKMSSYAFFVQTCREEHKKKHPDASVNFSEFSKKCSERWKTMSAKEKGKFEDMAQAD
KARYEREMKTYIPPKGET**

> sequência **86 D66N**

**GKGDPKKPRGKMSSYAFFVQTCREEHKKKHPDASVNFSEFSKKCSERWKTMSAKEKGKFEDMAKAN
KARYEREMKTYIPPKGET**

> sequência **87 D66Q**

**GKGDPKKPRGKMSSYAFFVQTCREEHKKKHPDASVNFSEFSKKCSERWKTMSAKEKGKFEDMAKAQ
KARYEREMKTYIPPKGET**

> sequência **88 K67N**

**GKGDPKKPRGKMSSYAFFVQTCREEHKKKHPDASVNFSEFSKKCSERWKTMSAKEKGKFEDMAKAD
NARYEREMKTYIPPKGET**

> sequência **89 K67Q**

**GKGDPKKPRGKMSSYAFFVQTCREEHKKKHPDASVNFSEFSKKCSERWKTMSAKEKGKFEDMAKAD
QARYEREMKTYIPPKGET**

> sequência **90 R69H**

**GKGDPKKPRGKMSSYAFFVQTCREEHKKKHPDASVNFSEFSKKCSERWKTMSAKEKGKFEDMAKAD
KAHYEREMKTYIPPKGET**

> sequência **91 R69Q**

**GKGDPKKPRGKMSSYAFFVQTCREEHKKKHPDASVNFSEFSKKCSERWKTMSAKEKGKFEDMAKAD
KAQYEREMKTYIPPKGET**

> sequência **92 Y70H**

**GKGDPKKPRGKMSSYAFFVQTCREEHKKKHPDASVNFSEFSKKCSERWKTMSAKEKGKFEDMAKAD
KARHEREMKTYIPPKGET**

> sequência **93 Y70I**

**GKGDPKKPRGKMSSYAFFVQTCREEHKKKHPDASVNFSEFSKKCSERWKTMSAKEKGKFEDMAKAD
KARIEREMKTYIPPKGET**

> sequência **94 E71Q**

**GKGDPKKPRGKMSSYAFFVQTCREEHKKKHPDASVNFSEFSKKCSERWKTMSAKEKGKFEDMAKAD
KARYQREMKTYIPPKGET**

Continuação da figura 1b

> sequência 95 E71H

GKGDPKKPRGKMSSYAFFVQTCREEHKKKHPDASVNFSEFSKKCSERWKTMSAKEKGKFEDMAKAD
KARYHREMPTYIPPKGET

> sequência 96 E71N

GKGDPKKPRGKMSSYAFFVQTCREEHKKKHPDASVNFSEFSKKCSERWKTMSAKEKGKFEDMAKAD
KARYNREMPTYIPPKGET

> sequência 97 R72H

GKGDPKKPRGKMSSYAFFVQTCREEHKKKHPDASVNFSEFSKKCSERWKTMSAKEKGKFEDMAKAD
KARYEHMPTYIPPKGET

> sequência 98 R72Q

GKGDPKKPRGKMSSYAFFVQTCREEHKKKHPDASVNFSEFSKKCSERWKTMSAKEKGKFEDMAKAD
KARYEQEMPTYIPPKGET

> sequência 99 E73Q

GKGDPKKPRGKMSSYAFFVQTCREEHKKKHPDASVNFSEFSKKCSERWKTMSAKEKGKFEDMAKAD
KARYERQMPTYIPPKGET

> sequência 100 E73H

GKGDPKKPRGKMSSYAFFVQTCREEHKKKHPDASVNFSEFSKKCSERWKTMSAKEKGKFEDMAKAD
KARYERHMPTYIPPKGET

> sequência 101 E73N

GKGDPKKPRGKMSSYAFFVQTCREEHKKKHPDASVNFSEFSKKCSERWKTMSAKEKGKFEDMAKAD
KARYERNMPTYIPPKGET

> sequência 102 M74I

GKGDPKKPRGKMSSYAFFVQTCREEHKKKHPDASVNFSEFSKKCSERWKTMSAKEKGKFEDMAKAD
KARYEREIKTYIPPKGET

> sequência 103 M74V

GKGDPKKPRGKMSSYAFFVQTCREEHKKKHPDASVNFSEFSKKCSERWKTMSAKEKGKFEDMAKAD
KARYEREVKTYIPPKGET

> sequência 104 K75N

GKGDPKKPRGKMSSYAFFVQTCREEHKKKHPDASVNFSEFSKKCSERWKTMSAKEKGKFEDMAKAD
KARYEREMNTYIPPKGET

> sequência 105 K75Q

GKGDPKKPRGKMSSYAFFVQTCREEHKKKHPDASVNFSEFSKKCSERWKTMSAKEKGKFEDMAKAD
KARYEREMQTYIPPKGET

> sequência 106 Y77H

GKGDPKKPRGKMSSYAFFVQTCREEHKKKHPDASVNFSEFSKKCSERWKTMSAKEKGKFEDMAKAD
KARYEREMKTHIPPKGET

> sequência 107 Y77I

GKGDPKKPRGKMSSYAFFVQTCREEHKKKHPDASVNFSEFSKKCSERWKTMSAKEKGKFEDMAKAD
KARYEREMKTIIPPKGET

> sequência 108 P79A

GKGDPKKPRGKMSSYAFFVQTCREEHKKKHPDASVNFSEFSKKCSERWKTMSAKEKGKFEDMAKAD
KARYEREMKTYIAPPKGET

Continuação da figura 1b

> sequência 109 P79S
GKGDPKKPRGKMSSYAFFVQTCREEHKKKHPDASVNFSEFSKKCSERWKTMSAKEKGKFEDMAKAD
KARYEREMKTYISPKGET

> sequência 110 P80A
GKGDPKKPRGKMSSYAFFVQTCREEHKKKHPDASVNFSEFSKKCSERWKTMSAKEKGKFEDMAKAD
KARYEREMKTYIPAKGET

> sequência 111 P80S
GKGDPKKPRGKMSSYAFFVQTCREEHKKKHPDASVNFSEFSKKCSERWKTMSAKEKGKFEDMAKAD
KARYEREMKTYIPSKGET

> sequência 112 K81N
GKGDPKKPRGKMSSYAFFVQTCREEHKKKHPDASVNFSEFSKKCSERWKTMSAKEKGKFEDMAKAD
KARYEREMKTYIPPNGET

> sequência 113 K81Q
GKGDPKKPRGKMSSYAFFVQTCREEHKKKHPDASVNFSEFSKKCSERWKTMSAKEKGKFEDMAKAD
KARYEREMKTYIPPGGET

> sequência 114 E83Q
GKGDPKKPRGKMSSYAFFVQTCREEHKKKHPDASVNFSEFSKKCSERWKTMSAKEKGKFEDMAKAD
KARYEREMKTYIPPGQT

> sequência 115 E83H
GKGDPKKPRGKMSSYAFFVQTCREEHKKKHPDASVNFSEFSKKCSERWKTMSAKEKGKFEDMAKAD
KARYEREMKTYIPPGHT

> sequência 116 E83N
GKGDPKKPRGKMSSYAFFVQTCREEHKKKHPDASVNFSEFSKKCSERWKTMSAKEKGKFEDMAKAD
KARYEREMKTYIPPGNT

Figura 2a

77 aminoácidos de Box A

Protecção contra proteólise
Se a sequência:

**PRGKMSSYAFFVQTCREEHKKKHPDASVNFSEFSKKCSERWKTMSAKEKGKFEDM
AKADKARYEREMKTYIPPKGET**

A negrito aminoácidos sensíveis a proteólise por proteases

Figura 2b

77 aminoácidos de Box A

Lista de mutantes:

P1A	F30V	E53H	P73S
P1S	E32Q	E53N	K74N
R2H	E32H	D54N	K74Q
R2Q	E32N	D54Q	E76Q
K4N	F33I	M55I	E76H
K4Q	F33V	M55V	E76N
M5I	K35N	K57N	
M5V	K35Q	K57Q	
Y8H	K36N	D59N	
Y8I	K36Q	D59Q	
F10I	E39Q	K60N	
F10V	E39H	K60Q	
F11I	E39N	R62H	
F11V	R40H	R62Q	
R16H	R40Q	Y63H	
R16Q	W41Y	Y63I	
E17Q	W41S	E64Q	
E17H	K42N	E64H	
E17N	K42Q	E64N	
E18Q	M44I	R65H	
E18H	M44V	R65Q	
E18N	K47N	E66Q	
K20N	K47Q	E66H	
K20Q	E48Q	E66N	
K21N	E48H	M67I	
K21Q	E48N	M67V	
K22N	K49N	K68N	
K22Q	K49Q	K68Q	
P24A	K51N	Y70H	
P24S	K51Q	Y70I	
D25N	F52I	P72A	
D25Q	F52V	P72S	
F30I	E53Q	P73A	

Continuação da figura 2b

Sequências de 77 aminoácidos de Box A:

> sequência 117 Natural

**PRGKMSSYAFFVQTCREEHKKKHPDASVNFSEFSKKCSERWKTMSAKEKGKFEDMAKADKARYEREM
KTYIPPKGET**

> sequência 118 P1A

**ARGKMSSYAFFVQTCREEHKKKHPDASVNFSEFSKKCSERWKTMSAKEKGKFEDMAKADKARYEREM
KTYIPPKGET**

> sequência 119 P1S

**SRGKMSSYAFFVQTCREEHKKKHPDASVNFSEFSKKCSERWKTMSAKEKGKFEDMAKADKARYEREM
KTYIPPKGET**

> sequência 120 R2H

**PHGKMSSYAFFVQTCREEHKKKHPDASVNFSEFSKKCSERWKTMSAKEKGKFEDMAKADKARYEREM
KTYIPPKGET**

> sequência 121 R2Q

**PQGKMSSYAFFVQTCREEHKKKHPDASVNFSEFSKKCSERWKTMSAKEKGKFEDMAKADKARYERE
MKTYPKGET**

> sequência 122 K4N

**PRGNMSSYAFFVQTCREEHKKKHPDASVNFSEFSKKCSERWKTMSAKEKGKFEDMAKADKARYEREM
KTYIPPKGET**

> sequência 123 K4Q

**PRGQMSSYAFFVQTCREEHKKKHPDASVNFSEFSKKCSERWKTMSAKEKGKFEDMAKADKARYERE
MKTYPKGET**

> sequência 124 M5I

**PRGKISSYAFFVQTCREEHKKKHPDASVNFSEFSKKCSERWKTMSAKEKGKFEDMAKADKARYEREM
KTYIPPKGET**

> sequência 125 M5V

**PRGKVSSYAFFVQTCREEHKKKHPDASVNFSEFSKKCSERWKTMSAKEKGKFEDMAKADKARYEREM
KTYIPPKGET**

> sequência 126 Y8H

**PRGKMSSHAFFVQTCREEHKKKHPDASVNFSEFSKKCSERWKTMSAKEKGKFEDMAKADKARYERE
MKTYPKGET**

> sequência 127 Y8I

**PRGKMSSIAFFVQTCREEHKKKHPDASVNFSEFSKKCSERWKTMSAKEKGKFEDMAKADKARYEREM
KTYIPPKGET**

> sequência 128 F10I

**PRGKMSSYAFFVQTCREEHKKKHPDASVNFSEFSKKCSERWKTMSAKEKGKFEDMAKADKARYEREM
KTYIPPKGET**

> sequência 129 F10V

PRGKMSSYAVFVQTCREEHKKKHPDASVNFSEFSKKCSERWKTMSAKEKGKFEDMAKADKARYERE

Continuação da figura 2b

MKTYIPPKGET> sequência **130 F11I****PRGKMSSYAFIVQTCREEHKKKHPDASVNFSEFSKKCSERWKTMSAKEKGKFEDMAKADKARYEREM
KTYIPPKGET**> sequência **131 F11V****PRGKMSSYAFVVQTCREEHKKKHPDASVNFSEFSKKCSERWKTMSAKEKGKFEDMAKADKARYERE
MKTYIPPKGET**> sequência **132 R16H****PRGKMSSYAFFVQTCHEEHKKKHPDASVNFSEFSKKCSERWKTMSAKEKGKFEDMAKADKARYEREM
KTYIPPKGET**> sequência **133 R16Q****PRGKMSSYAFFVQTCQEEHKKKHPDASVNFSEFSKKCSERWKTMSAKEKGKFEDMAKADKARYERE
MKTYIPPKGET**> sequência **134 E17Q****PRGKMSSYAFFVQTCRQEHKKKHPDASVNFSEFSKKCSERWKTMSAKEKGKFEDMAKADKARYERE
MKTYIPPKGET**> sequência **135 E17H****PRGKMSSYAFFVQTCRHEHKKKHPDASVNFSEFSKKCSERWKTMSAKEKGKFEDMAKADKARYERE
MKTYIPPKGET**> sequência **136 E17N****PRGKMSSYAFFVQTCRNEHKKKHPDASVNFSEFSKKCSERWKTMSAKEKGKFEDMAKADKARYERE
MKTYIPPKGET**> sequência **137 E18Q****PRGKMSSYAFFVQTCREQHKKKHPDASVNFSEFSKKCSERWKTMSAKEKGKFEDMAKADKARYERE
MKTYIPPKGET**> sequência **138 E18H****PRGKMSSYAFFVQTCREHHKKKHPDASVNFSEFSKKCSERWKTMSAKEKGKFEDMAKADKARYERE
MKTYIPPKGET**> sequência **139 E18N****PRGKMSSYAFFVQTCRENHKKKHPDASVNFSEFSKKCSERWKTMSAKEKGKFEDMAKADKARYERE
MKTYIPPKGET**> sequência **140 K20N****PRGKMSSYAFFVQTCREEHNKKHPDASVNFSEFSKKCSERWKTMSAKEKGKFEDMAKADKARYEREM
KTYIPPKGET**> sequência **141 K20Q****PRGKMSSYAFFVQTCREEHQKKHPDASVNFSEFSKKCSERWKTMSAKEKGKFEDMAKADKARYERE
MKTYIPPKGET**> sequência **142 K21N****PRGKMSSYAFFVQTCREEHKNKHPDASVNFSEFSKKCSERWKTMSAKEKGKFEDMAKADKARYEREM
KTYIPPKGET**> sequência **143 K21Q****PRGKMSSYAFFVQTCREEHQKHPDASVNFSEFSKKCSERWKTMSAKEKGKFEDMAKADKARYERE**

Continuação da figura 2b

MKTYIPPKGET> sequência **144 K22N****PRGKMSSYAFFVQTCREEHKKNHDPASVNFSEFSKKCSERWKTMSAKEKGKFEDMAKADKARYEREM
KTYIPPKGET**> sequência **145 K22Q****PRGKMSSYAFFVQTCREEHKKQHPDASVNFSEFSKKCSERWKTMSAKEKGKFEDMAKADKARYERE
MKTYIPPKGET**> sequência **146 P24A****PRGKMSSYAFFVQTCREEHKKKHADASVNFSEFSKKCSERWKTMSAKEKGKFEDMAKADKARYEREM
KTYIPPKGET**> sequência **147 P24S****PRGKMSSYAFFVQTCREEHKKKHSDASVNFSEFSKKCSERWKTMSAKEKGKFEDMAKADKARYEREM
KTYIPPKGET**> sequência **148 D25N****PRGKMSSYAFFVQTCREEHKKKHPNASVNFSEFSKKCSERWKTMSAKEKGKFEDMAKADKARYEREM
KTYIPPKGET**> sequência **149 D25Q****PRGKMSSYAFFVQTCREEHKKKHPQASVNFSEFSKKCSERWKTMSAKEKGKFEDMAKADKARYERE
MKTYIPPKGET**> sequência **150 F30I****PRGKMSSYAFFVQTCREEHKKKHPDASVNISEFSKKCSERWKTMSAKEKGKFEDMAKADKARYEREM
KTYIPPKGET**> sequência **151 F30V****PRGKMSSYAFFVQTCREEHKKKHPDASVNVSEFSKKCSERWKTMSAKEKGKFEDMAKADKARYERE
MKTYIPPKGET**> sequência **152 E32Q****PRGKMSSYAFFVQTCREEHKKKHPDASVNFSEQFSKKCSERWKTMSAKEKGKFEDMAKADKARYERE
MKTYIPPKGET**> sequência **153 E32H****PRGKMSSYAFFVQTCREEHKKKHPDASVNFSEFSKKCSERWKTMSAKEKGKFEDMAKADKARYERE
MKTYIPPKGET**> sequência **154 E32N****PRGKMSSYAFFVQTCREEHKKKHPDASVNFSEFSKKCSERWKTMSAKEKGKFEDMAKADKARYERE
MKTYIPPKGET**> sequência **155 F33I****PRGKMSSYAFFVQTCREEHKKKHPDASVNFSEISKKCSERWKTMSAKEKGKFEDMAKADKARYEREM
KTYIPPKGET**> sequência **156 F33V****PRGKMSSYAFFVQTCREEHKKKHPDASVNFSEVSKKCSERWKTMSAKEKGKFEDMAKADKARYERE
MKTYIPPKGET**> sequência **157 K35N****PRGKMSSYAFFVQTCREEHKKKHPDASVNFSEFSNKKCSERWKTMSAKEKGKFEDMAKADKARYEREM**

Continuação da figura 2b

KTYIPPKGET

> sequência **158 K35Q**

PRGKMSSYAFFVQTCREEHKKKHPDASVNFSEFSQKCSERWKTMSAKEKGKFEDMAKADKARYERE
MKTYIPPKGET

> sequência **159 K36N**

PRGKMSSYAFFVQTCREEHKKKHPDASVNFSEFSKNCSEWKTMSAKEKGKFEDMAKADKARYEREM
KTYIPPKGET

> sequência **160 K36Q**

PRGKMSSYAFFVQTCREEHKKKHPDASVNFSEFSKQCSERWKTMSAKEKGKFEDMAKADKARYERE
MKTYIPPKGET

> sequência **161 E39Q**

PRGKMSSYAFFVQTCREEHKKKHPDASVNFSEFSKKCSQRWKTMSAKEKGKFEDMAKADKARYERE
MKTYIPPKGET

> sequência **162 E39H**

PRGKMSSYAFFVQTCREEHKKKHPDASVNFSEFSKKCSHRWKTMSAKEKGKFEDMAKADKARYERE
MKTYIPPKGET

> sequência **163 E39N**

PRGKMSSYAFFVQTCREEHKKKHPDASVNFSEFSKKCSNRWKTMSAKEKGKFEDMAKADKARYERE
MKTYIPPKGET

> sequência **164 R40H**

PRGKMSSYAFFVQTCREEHKKKHPDASVNFSEFSKKCSEHWKTMSAKEKGKFEDMAKADKARYEREM
KTYIPPKGET

> sequência **165 R40Q**

PRGKMSSYAFFVQTCREEHKKKHPDASVNFSEFSKKCSEQWKTMSAKEKGKFEDMAKADKARYERE
MKTYIPPKGET

> sequência **166 W41Y**

PRGKMSSYAFFVQTCREEHKKKHPDASVNFSEFSKKCSERYKTMSAKEKGKFEDMAKADKARYEREM
KTYIPPKGET

> sequência **167 W41S**

PRGKMSSYAFFVQTCREEHKKKHPDASVNFSEFSKKCSERSKTMSAKEKGKFEDMAKADKARYEREM
KTYIPPKGET

> sequência **168 K42N**

PRGKMSSYAFFVQTCREEHKKKHPDASVNFSEFSKKCSERWNTMSAKEKGKFEDMAKADKARYEREM
KTYIPPKGET

> sequência **169 K42Q**

PRGKMSSYAFFVQTCREEHKKKHPDASVNFSEFSKKCSERWQTMSAKEKGKFEDMAKADKARYERE
MKTYIPPKGET

> sequência **170 M44I**

PRGKMSSYAFFVQTCREEHKKKHPDASVNFSEFSKKCSERWKTMSAKEKGKFEDMAKADKARYEREM
KTYIPPKGET

> sequência **171 M44V**

Continuação da figura 2b

**PRGKMSSYAFFVQTCREEHKKKHPDASVNFSEFSKKCSERWKTVSAKEKGKFEDMAKADKARYEREM
KTYIPPKGET**

> sequência **172 K47N**

**PRGKMSSYAFFVQTCREEHKKKHPDASVNFSEFSKKCSERWKTMSANEKGKFEDMAKADKARYEREM
KTYIPPKGET**

> sequência **173 K47Q**

**PRGKMSSYAFFVQTCREEHKKKHPDASVNFSEFSKKCSERWKTMSAQEKGKFEDMAKADKARYERE
MKTYIPPKGET**

> sequência **174 E48Q**

**PRGKMSSYAFFVQTCREEHKKKHPDASVNFSEFSKKCSERWKTMSAKQKGKFEDMAKADKARYERE
MKTYIPPKGET**

> sequência **175 E48H**

**PRGKMSSYAFFVQTCREEHKKKHPDASVNFSEFSKKCSERWKTMSAKHKGKFEDMAKADKARYERE
MKTYIPPKGET**

> sequência **176 E48N**

**PRGKMSSYAFFVQTCREEHKKKHPDASVNFSEFSKKCSERWKTMSAKNKGKFEDMAKADKARYERE
MKTYIPPKGET**

> sequência **177 K49N**

**PRGKMSSYAFFVQTCREEHKKKHPDASVNFSEFSKKCSERWKTMSAKENGKFEDMAKADKARYEREM
KTYIPPKGET**

> sequência **178 K49Q**

**PRGKMSSYAFFVQTCREEHKKKHPDASVNFSEFSKKCSERWKTMSAKEQGKFEDMAKADKARYERE
MKTYIPPKGET**

> sequência **179 K51N**

**PRGKMSSYAFFVQTCREEHKKKHPDASVNFSEFSKKCSERWKTMSAKEKGNFEDMAKADKARYEREM
KTYIPPKGET**

> sequência **180 K51Q**

**PRGKMSSYAFFVQTCREEHKKKHPDASVNFSEFSKKCSERWKTMSAKEKGQFEDMAKADKARYERE
MKTYIPPKGET**

> sequência **181 F52I**

**PRGKMSSYAFFVQTCREEHKKKHPDASVNFSEFSKKCSERWKTMSAKEKGKIEDMAKADKARYEREM
KTYIPPKGET**

> sequência **182 F52V**

**PRGKMSSYAFFVQTCREEHKKKHPDASVNFSEFSKKCSERWKTMSAKEKGKVEDMAKADKARYERE
MKTYIPPKGET**

> sequência **183 E53Q**

**PRGKMSSYAFFVQTCREEHKKKHPDASVNFSEFSKKCSERWKTMSAKEKGKFQDMAKADKARYERE
MKTYIPPKGET**

> sequência **184 E53H**

**PRGKMSSYAFFVQTCREEHKKKHPDASVNFSEFSKKCSERWKTMSAKEKGKFHDMADKARYERE
MKTYIPPKGET**

Continuação da figura 2b

> sequência 185 E53N

**PRGKMSSYAFFVQTCREEHKKKHPDASVNFSEFSKKCSERWKTMSAKEKGKFNDMAKADKARYERE
MKTYIPPKGET**

> sequência 186 D54N

**PRGKMSSYAFFVQTCREEHKKKHPDASVNFSEFSKKCSERWKTMSAKEKGKFENMAKADKARYEREM
KTYIPPKGET**

> sequência 187 D54Q

**PRGKMSSYAFFVQTCREEHKKKHPDASVNFSEFSKKCSERWKTMSAKEKGKFEQMAKADKARYERE
MKTYIPPKGET**

> sequência 188 M55I

**PRGKMSSYAFFVQTCREEHKKKHPDASVNFSEFSKKCSERWKTMSAKEKGKFEDIAKADKARYEREM
KTYIPPKGET**

> sequência 189 M55V

**PRGKMSSYAFFVQTCREEHKKKHPDASVNFSEFSKKCSERWKTMSAKEKGKFEDVAKADKARYEREM
KTYIPPKGET**

> sequência 190 K57N

**PRGKMSSYAFFVQTCREEHKKKHPDASVNFSEFSKKCSERWKTMSAKEKGKFEDMANADKARYEREM
KTYIPPKGET**

> sequência 191 K57Q

**PRGKMSSYAFFVQTCREEHKKKHPDASVNFSEFSKKCSERWKTMSAKEKGKFEDMAQADKARYERE
MKTYIPPKGET**

> sequência 192 D59N

**PRGKMSSYAFFVQTCREEHKKKHPDASVNFSEFSKKCSERWKTMSAKEKGKFEDMAKANKARYEREM
KTYIPPKGET**

> sequência 193 D59Q

**PRGKMSSYAFFVQTCREEHKKKHPDASVNFSEFSKKCSERWKTMSAKEKGKFEDMAKAQKARYERE
MKTYIPPKGET**

> sequência 194 K60N

**PRGKMSSYAFFVQTCREEHKKKHPDASVNFSEFSKKCSERWKTMSAKEKGKFEDMAKADNARYEREM
KTYIPPKGET**

> sequência 195 K60Q

**PRGKMSSYAFFVQTCREEHKKKHPDASVNFSEFSKKCSERWKTMSAKEKGKFEDMAKADQARYERE
MKTYIPPKGET**

> sequência 196 R62H

**PRGKMSSYAFFVQTCREEHKKKHPDASVNFSEFSKKCSERWKTMSAKEKGKFEDMAKADKAHYEREM
KTYIPPKGET**

> sequência 197 R62Q

**PRGKMSSYAFFVQTCREEHKKKHPDASVNFSEFSKKCSERWKTMSAKEKGKFEDMAKADKAQYERE
MKTYIPPKGET**

> sequência 198 Y63H

**PRGKMSSYAFFVQTCREEHKKKHPDASVNFSEFSKKCSERWKTMSAKEKGKFEDMAKADKARHERE
MKTYIPPKGET**

Continuação da figura 2b

- > sequência 199 Y63I
PRGKMSSYAFFVQTCREEHKKKHPDASVNFSEFSKKCSERWKTMSAKEKGKFEDMAKADKARIEREM
KTYIPPKGET
- > sequência 200 E64Q
PRGKMSSYAFFVQTCREEHKKKHPDASVNFSEFSKKCSERWKTMSAKEKGKFEDMAKADKARYQRE
MKTYIPPKGET
- > sequência 201 E64H
PRGKMSSYAFFVQTCREEHKKKHPDASVNFSEFSKKCSERWKTMSAKEKGKFEDMAKADKARYHRE
MKTYIPPKGET
- > sequência 202 E64N
PRGKMSSYAFFVQTCREEHKKKHPDASVNFSEFSKKCSERWKTMSAKEKGKFEDMAKADKARYNRE
MKTYIPPKGET
- > sequência 203 R65H
PRGKMSSYAFFVQTCREEHKKKHPDASVNFSEFSKKCSERWKTMSAKEKGKFEDMAKADKARYEHM
KTYIPPKGET
- > sequência 204 R65Q
PRGKMSSYAFFVQTCREEHKKKHPDASVNFSEFSKKCSERWKTMSAKEKGKFEDMAKADKARYEQE
MKTYIPPKGET
- > sequência 205 E66Q
PRGKMSSYAFFVQTCREEHKKKHPDASVNFSEFSKKCSERWKTMSAKEKGKFEDMAKADKARYERQ
MKTYIPPKGET
- > sequência 206 E66H
PRGKMSSYAFFVQTCREEHKKKHPDASVNFSEFSKKCSERWKTMSAKEKGKFEDMAKADKARYERH
MKTYIPPKGET
- > sequência 207 E66N
PRGKMSSYAFFVQTCREEHKKKHPDASVNFSEFSKKCSERWKTMSAKEKGKFEDMAKADKARYERN
MKTYIPPKGET
- > sequência 208 M67I
PRGKMSSYAFFVQTCREEHKKKHPDASVNFSEFSKKCSERWKTMSAKEKGKFEDMAKADKARYEREI
KTYIPPKGET
- > sequência 209 M67V
PRGKMSSYAFFVQTCREEHKKKHPDASVNFSEFSKKCSERWKTMSAKEKGKFEDMAKADKARYEREV
KTYIPPKGET
- > sequência 210 K68N
PRGKMSSYAFFVQTCREEHKKKHPDASVNFSEFSKKCSERWKTMSAKEKGKFEDMAKADKARYEREM
NTYIPPKGET
- > sequência 211 K68Q
PRGKMSSYAFFVQTCREEHKKKHPDASVNFSEFSKKCSERWKTMSAKEKGKFEDMAKADKARYEREM
QTYIPPKGET
- > sequência 212 Y70H
PRGKMSSYAFFVQTCREEHKKKHPDASVNFSEFSKKCSERWKTMSAKEKGKFEDMAKADKARYEREM

Continuação da figura 2b

KTHIPPKGET

> sequência **213 Y70I**

**PRGKMSSYAFFVQTCREEHKKKHPDASVNFSEFSKKCSERWKTMSAKEKGKFEDMAKADKARYEREM
KTIIPPKGET**

> sequência **214 P72A**

**PRGKMSSYAFFVQTCREEHKKKHPDASVNFSEFSKKCSERWKTMSAKEKGKFEDMAKADKARYEREM
KTYIAPKGET**

> sequência **215 P72S**

**PRGKMSSYAFFVQTCREEHKKKHPDASVNFSEFSKKCSERWKTMSAKEKGKFEDMAKADKARYEREM
KTYISPKGET**

> sequência **216 P73A**

**PRGKMSSYAFFVQTCREEHKKKHPDASVNFSEFSKKCSERWKTMSAKEKGKFEDMAKADKARYEREM
KTYIPAKGET**

> sequência **217 P73S**

**PRGKMSSYAFFVQTCREEHKKKHPDASVNFSEFSKKCSERWKTMSAKEKGKFEDMAKADKARYEREM
KTYIPSKGET**

> sequência **218 K74N**

**PRGKMSSYAFFVQTCREEHKKKHPDASVNFSEFSKKCSERWKTMSAKEKGKFEDMAKADKARYEREM
KTYIPPNGET**

> sequência **219 K74Q**

**PRGKMSSYAFFVQTCREEHKKKHPDASVNFSEFSKKCSERWKTMSAKEKGKFEDMAKADKARYEREM
KTYIPPGGET**

> sequência **220 E76Q**

**PRGKMSSYAFFVQTCREEHKKKHPDASVNFSEFSKKCSERWKTMSAKEKGKFEDMAKADKARYEREM
KTYIPPKGQT**

> sequência **221 E76H**

**PRGKMSSYAFFVQTCREEHKKKHPDASVNFSEFSKKCSERWKTMSAKEKGKFEDMAKADKARYEREM
KTYIPPKGHT**

> sequência **222 E76N**

**PRGKMSSYAFFVQTCREEHKKKHPDASVNFSEFSKKCSERWKTMSAKEKGKFEDMAKADKARYEREM
KTYIPPKGNT**

Figura 3a

54 aminoácidos de Box A

Protecção contra proteólise
Se a sequência:

PDASVNFSEFSKKCSERWKTMSAKEKGKFEDMAKADKARYEREMKTYIPPKGET

A negrito aminoácidos sensíveis a proteólise por proteases

Figura 3b

54 aminoácidos de Box A

Lista de mutantes:

P1A	F29I	P50A
P1S	F29V	P50S
D2N	E30Q	K51N
D2Q	E30H	K51Q
F7I	E30N	E53Q
F7V	D31N	E53H
E9Q	D31Q	E53N
E9H	M32I	
E9N	M32V	
F10I	K34N	
F10V	K34Q	
K12N	D36N	
K12Q	D36Q	
K13N	K37N	
K13Q	K37Q	
E16Q	R39H	
E16H	R39Q	
E16N	Y40H	
R17H	Y40I	
R17Q	E41Q	
W18Y	E41H	
W18S	E41N	
K19N	R42H	
K19Q	R42Q	
M21I	E43Q	
M21V	E43H	
K24N	E43N	
K24Q	M44I	
E25Q	M44V	
E25H	K45N	
E25N	K45Q	
K26N	Y47H	
K26Q	Y47I	
K28N	P49A	
K28Q	P49S	

Continuação da figura 3b

Sequências de 54 aminoácidos de Box A:

> sequência **223 Natural****PDASVNFSEFSKKCSERWKTMSAKEKGKFEDMAKADKARYEREMKTYIPPKGET**> sequência **224 P1A****ADASVNFSEFSKKCSERWKTMSAKEKGKFEDMAKADKARYEREMKTYIPPKGET**> sequência **225 P1S****SDASVNFSEFSKKCSERWKTMSAKEKGKFEDMAKADKARYEREMKTYIPPKGET**> sequência **226 D2N****PNASVNFSEFSKKCSERWKTMSAKEKGKFEDMAKADKARYEREMKTYIPPKGET**> sequência **227 D2Q****PQASVNFSEFSKKCSERWKTMSAKEKGKFEDMAKADKARYEREMKTYIPPKGET**> sequência **228 F7I****PDASVNISEFSKKCSERWKTMSAKEKGKFEDMAKADKARYEREMKTYIPPKGET**> sequência **229 F7V****PDASVNVSEFSKKCSERWKTMSAKEKGKFEDMAKADKARYEREMKTYIPPKGET**> sequência **230 E9Q****PDASVNFSEQFSKKCSERWKTMSAKEKGKFEDMAKADKARYEREMKTYIPPKGET**> sequência **231 E9H****PDASVNFSEHFSKKCSERWKTMSAKEKGKFEDMAKADKARYEREMKTYIPPKGET**> sequência **232 E9N****PDASVNFSEHFSKKCSERWKTMSAKEKGKFEDMAKADKARYEREMKTYIPPKGET**> sequência **233 F10I****PDASVNFSEISKKCSERWKTMSAKEKGKFEDMAKADKARYEREMKTYIPPKGET**> sequência **234 F10V****PDASVNFSEVSKKCSERWKTMSAKEKGKFEDMAKADKARYEREMKTYIPPKGET**> sequência **235 K12N****PDASVNFSEFSNKKCSERWKTMSAKEKGKFEDMAKADKARYEREMKTYIPPKGET**> sequência **236 K12Q****PDASVNFSEFSQKCSERWKTMSAKEKGKFEDMAKADKARYEREMKTYIPPKGET**> sequência **237 K13N****PDASVNFSEFSKNCSERWKTMSAKEKGKFEDMAKADKARYEREMKTYIPPKGET**> sequência **238 K13Q****PDASVNFSEFSKQCSERWKTMSAKEKGKFEDMAKADKARYEREMKTYIPPKGET**> sequência **239 E16Q****PDASVNFSEFSKCSQRWKTMSAKEKGKFEDMAKADKARYEREMKTYIPPKGET**

Continuação da figura 3b

- > sequência 240 E16H
PDASVNFSEFSKKCSHRWKTMSAKEKGKFEDMAKADKARYEREMKTYIPPKGET
- > sequência 241 E16N
PDASVNFSEFSKKCSNRWKTMSAKEKGKFEDMAKADKARYEREMKTYIPPKGET
- > sequência 242 R17H
PDASVNFSEFSKKCSEHWKTMSAKEKGKFEDMAKADKARYEREMKTYIPPKGET
- > sequência 243 R17Q
PDASVNFSEFSKKCSEQWKTMSAKEKGKFEDMAKADKARYEREMKTYIPPKGET
- > sequência 244 W18Y
PDASVNFSEFSKKCSERYKTMSAKEKGKFEDMAKADKARYEREMKTYIPPKGET
- > sequência 245 W18S
PDASVNFSEFSKKCSERSKTMSAKEKGKFEDMAKADKARYEREMKTYIPPKGET
- > sequência 246 K19N
PDASVNFSEFSKKCSERWNTMSAKEKGKFEDMAKADKARYEREMKTYIPPKGET
- > sequência 247 K19Q
PDASVNFSEFSKKCSERWQTMSAKEKGKFEDMAKADKARYEREMKTYIPPKGET
- > sequência 248 M21I
PDASVNFSEFSKKCSERWKTISAKEKGKFEDMAKADKARYEREMKTYIPPKGET
- > sequência 249 M21V
PDASVNFSEFSKKCSERWKTVSAKEKGKFEDMAKADKARYEREMKTYIPPKGET
- > sequência 250 K24N
PDASVNFSEFSKKCSERWKTMSANEKGKFEDMAKADKARYEREMKTYIPPKGET
- > sequência 251 K24Q
PDASVNFSEFSKKCSERWKTMSAQEKGKFEDMAKADKARYEREMKTYIPPKGET
- > sequência 252 E25Q
PDASVNFSEFSKKCSERWKTMSAKQKGKFEDMAKADKARYEREMKTYIPPKGET
- > sequência 253 E25H
PDASVNFSEFSKKCSERWKTMSAKHKGKFEDMAKADKARYEREMKTYIPPKGET
- > sequência 254 E25N
PDASVNFSEFSKKCSERWKTMSAKNKGKFEDMAKADKARYEREMKTYIPPKGET
- > sequência 255 K26N
PDASVNFSEFSKKCSERWKTMSAKENGKFEDMAKADKARYEREMKTYIPPKGET
- > sequência 256 K26Q
PDASVNFSEFSKKCSERWKTMSAKEQKGKFEDMAKADKARYEREMKTYIPPKGET
- > sequência 257 K28N
PDASVNFSEFSKKCSERWKTMSAKEKGNFEDMAKADKARYEREMKTYIPPKGET
- > sequência 258 K28Q

Continuação da figura 3b

PDASVNFSEFSKKCSERWKTMSAKEKGQFEDMAKADKARYEREMKTYIPPKGET

> sequência **259 F29I**

PDASVNFSEFSKKCSERWKTMSAKEKGKIEDMAKADKARYEREMKTYIPPKGET

> sequência **260 F29V**

PDASVNFSEFSKKCSERWKTMSAKEKGKVEDMAKADKARYEREMKTYIPPKGET

> sequência **261 E30Q**

PDASVNFSEFSKKCSERWKTMSAKEKGKFQDMAKADKARYEREMKTYIPPKGET

> sequência **262 E30H**

PDASVNFSEFSKKCSERWKTMSAKEKGKFHDMADKARYEREMKTYIPPKGET

> sequência **263 E30N**

PDASVNFSEFSKKCSERWKTMSAKEKGKFNDMAKADKARYEREMKTYIPPKGET

> sequência **264 D31N**

PDASVNFSEFSKKCSERWKTMSAKEKGKFENMAKADKARYEREMKTYIPPKGET

> sequência **265 D31Q**

PDASVNFSEFSKKCSERWKTMSAKEKGKFEQMAKADKARYEREMKTYIPPKGET

> sequência **266 M32I**

PDASVNFSEFSKKCSERWKTMSAKEKGKFEDIAKADKARYEREMKTYIPPKGET

> sequência **267 M32V**

PDASVNFSEFSKKCSERWKTMSAKEKGKFEDVAKADKARYEREMKTYIPPKGET

> sequência **268 K34N**

PDASVNFSEFSKKCSERWKTMSAKEKGKFEDMANADKARYEREMKTYIPPKGET

> sequência **269 K34Q**

PDASVNFSEFSKKCSERWKTMSAKEKGKFEDMAQADKARYEREMKTYIPPKGET

> sequência **270 D36N**

PDASVNFSEFSKKCSERWKTMSAKEKGKFEDMAKANKARYEREMKTYIPPKGET

> sequência **271 D36Q**

PDASVNFSEFSKKCSERWKTMSAKEKGKFEDMAKAQKARYEREMKTYIPPKGET

> sequência **272 K37N**

PDASVNFSEFSKKCSERWKTMSAKEKGKFEDMAKADNARYEREMKTYIPPKGET

> sequência **273 K37Q**

PDASVNFSEFSKKCSERWKTMSAKEKGKFEDMAKADQARYEREMKTYIPPKGET

> sequência **274 R39H**

PDASVNFSEFSKKCSERWKTMSAKEKGKFEDMAKADKAHYEREMKTYIPPKGET

> sequência **275 R39Q**

PDASVNFSEFSKKCSERWKTMSAKEKGKFEDMAKADKAQYEREMKTYIPPKGET

> sequência **276 Y40H**

PDASVNFSEFSKKCSERWKTMSAKEKGKFEDMAKADKARHEREMKTYIPPKGET

Continuação da figura 3b

> sequência 277 Y40I
PDASVNFSEFSKKCSERWKTMSAKEKGKFEDMAKADKARIEREMKTYIPPKGET

> sequência 278 E41Q
PDASVNFSEFSKKCSERWKTMSAKEKGKFEDMAKADKARYQREMKTYPKGET

> sequência 279 E41H
PDASVNFSEFSKKCSERWKTMSAKEKGKFEDMAKADKARYHREMKTYPKGET

> sequência 280 E41N
PDASVNFSEFSKKCSERWKTMSAKEKGKFEDMAKADKARYNREMKTYPKGET

> sequência 281 R42H
PDASVNFSEFSKKCSERWKTMSAKEKGKFEDMAKADKARYEHMKTYPKGET

> sequência 282 R42Q
PDASVNFSEFSKKCSERWKTMSAKEKGKFEDMAKADKARYEQEMKTYPKGET

> sequência 283 E43Q
PDASVNFSEFSKKCSERWKTMSAKEKGKFEDMAKADKARYERQMKTYPKGET

> sequência 284 E43H
PDASVNFSEFSKKCSERWKTMSAKEKGKFEDMAKADKARYERHMKTYIPPKGET

> sequência 285 E43N
PDASVNFSEFSKKCSERWKTMSAKEKGKFEDMAKADKARYERNMKTYPKGET

> sequência 286 M44I
PDASVNFSEFSKKCSERWKTMSAKEKGKFEDMAKADKARYEREIKTYIPPKGET

> sequência 287 M44V
PDASVNFSEFSKKCSERWKTMSAKEKGKFEDMAKADKARYEREVKTYIPPKGET

> sequência 288 K45N
PDASVNFSEFSKKCSERWKTMSAKEKGKFEDMAKADKARYEREMNTYIPPKGET

> sequência 289 K45Q
PDASVNFSEFSKKCSERWKTMSAKEKGKFEDMAKADKARYEREMQTYIPPKGET

> sequência 290 Y47H
PDASVNFSEFSKKCSERWKTMSAKEKGKFEDMAKADKARYEREMKTHIPPKGET

> sequência 291 Y47I
PDASVNFSEFSKKCSERWKTMSAKEKGKFEDMAKADKARYEREMKTIIPPKGET

> sequência 292 P49A
PDASVNFSEFSKKCSERWKTMSAKEKGKFEDMAKADKARYEREMKTYIAPKGET

> sequência 293 P49S
PDASVNFSEFSKKCSERWKTMSAKEKGKFEDMAKADKARYEREMKTYISPKGET

> sequência 294 P50A
PDASVNFSEFSKKCSERWKTMSAKEKGKFEDMAKADKARYEREMKTYIPAKGET

Continuação da figura 3b

> sequência **295 P50S**
PDASVNFSEFSKKCSERWKTMSAKEKGKFEDMAKADKARYEREMKTYIPSKGET

> sequência **296 K51N**
PDASVNFSEFSKKCSERWKTMSAKEKGKFEDMAKADKARYEREMKTYIPPNGET

> sequência **297 K51Q**
PDASVNFSEFSKKCSERWKTMSAKEKGKFEDMAKADKARYEREMKTYIPPQGET

> sequência **298 E53Q**
PDASVNFSEFSKKCSERWKTMSAKEKGKFEDMAKADKARYEREMKTYIPPKGQT

> sequência **299 E53H**
PDASVNFSEFSKKCSERWKTMSAKEKGKFEDMAKADKARYEREMKTYIPPKGHT

> sequência **300 E53N**
PDASVNFSEFSKKCSERWKTMSAKEKGKFEDMAKADKARYEREMKTYIPPKGNT

Figura 4a

84 aminoácidos de Box A de HMGB1 de *Anopheles gambia* (XP_311154)

Protecção contra proteólise
Se a sequência:

GKVKDNKPRGRMTAYAFFVQTCREEHKKKHPEEQVIFAEFSRKCAERWKTMLDKEK
QRFHEMAEKDKARYELEMQSYVPPKGAV

A negrito aminoácidos sensíveis a proteólise por proteases

Figura 4b

84 aminoácidos de Box A

Lista de mutantes:

K2N	E24H	F40V	K56N	E71H
K2Q	E24N	R42H	K56Q	E71N
K4N	E25Q	R42Q	R58H	L72I
K4Q	E25H	K43N	R58Q	L72V
D5N	E25N	K43Q	F59I	E73Q
D5Q	K27N	E46Q	F59V	E73H
K7N	K27Q	E46H	E61Q	E73N
K7Q	K28N	E46N	E61H	M74I
P8A	K28Q	R47H	E61N	M74V
P8S	K29N	R47Q	M62I	Y77H
R9H	K29Q	W48Y	M62V	Y77I
R9Q	P31A	W48S	E64Q	P79A
R11H	P31S	K49N	E64H	P79S
R11Q	E32Q	K49Q	E64N	P80A
M12I	E32H	M51I	K65N	P80S
M12V	E32N	M51V	K65Q	K81N
Y15H	E33Q	L52I	D66N	K81Q
Y15I	E33H	L52V	D66Q	
F17I	E33N	D53N	K67N	
F17V	F37I	D53Q	K67Q	
F18I	F37V	K54N	R69H	
F18V	E39Q	K54Q	R69Q	
R23H	E39H	E55Q	Y70H	
R23Q	E39N	E55H	Y70I	
E24Q	F40I	E55N	E71Q	

Continuação da figura 4b

> SEQUÊNCIA 301 Natural
GKVKDNKPRGRMTAYAFFVQTCREEHKKKHPEEQVIFAEFSRKCAERWKTMLDKEKQRFHEMAEKDK
ARYELEMQSYVPPKGAV

>> SEQUÊNCIA 302 K2N
GNVKDNKPRGRMTAYAFFVQTCREEHKKKHPEEQVIFAEFSRKCAERWKTMLDKEKQRFHEMAEKDK
ARYELEMQSYVPPKGAV

>> SEQUÊNCIA 303 K2Q
GQVKDNKPRGRMTAYAFFVQTCREEHKKKHPEEQVIFAEFSRKCAERWKTMLDKEKQRFHEMAEKDK
ARYELEMQSYVPPKGAV

>> SEQUÊNCIA 304 K4N
GKVNDNKPRGRMTAYAFFVQTCREEHKKKHPEEQVIFAEFSRKCAERWKTMLDKEKQRFHEMAEKDK
ARYELEMQSYVPPKGAV

>> SEQUÊNCIA 305 K4Q
GKVQDNKPRGRMTAYAFFVQTCREEHKKKHPEEQVIFAEFSRKCAERWKTMLDKEKQRFHEMAEKDK
ARYELEMQSYVPPKGAV

>> SEQUÊNCIA 306 D5N
GKVKNNKPRGRMTAYAFFVQTCREEHKKKHPEEQVIFAEFSRKCAERWKTMLDKEKQRFHEMAEKDK
ARYELEMQSYVPPKGAV

>> SEQUÊNCIA 307 D5Q
GKVQDNKPRGRMTAYAFFVQTCREEHKKKHPEEQVIFAEFSRKCAERWKTMLDKEKQRFHEMAEKDK
ARYELEMQSYVPPKGAV

>> SEQUÊNCIA 308 K7N
GKVKDNNKPRGRMTAYAFFVQTCREEHKKKHPEEQVIFAEFSRKCAERWKTMLDKEKQRFHEMAEKDK
ARYELEMQSYVPPKGAV

>> SEQUÊNCIA 309 K7Q
GKVKDNQPRGRMTAYAFFVQTCREEHKKKHPEEQVIFAEFSRKCAERWKTMLDKEKQRFHEMAEKDK
ARYELEMQSYVPPKGAV

>> SEQUÊNCIA 310 P8A
GKVKDNKARGRMTAYAFFVQTCREEHKKKHPEEQVIFAEFSRKCAERWKTMLDKEKQRFHEMAEKDK
ARYELEMQSYVPPKGAV

>> SEQUÊNCIA 311 P8S
GKVKDNKSRGRMTAYAFFVQTCREEHKKKHPEEQVIFAEFSRKCAERWKTMLDKEKQRFHEMAEKDK
ARYELEMQSYVPPKGAV

>> SEQUÊNCIA 312 R9H
GKVKDNKPHGRMTAYAFFVQTCREEHKKKHPEEQVIFAEFSRKCAERWKTMLDKEKQRFHEMAEKDK
ARYELEMQSYVPPKGAV

>> SEQUÊNCIA 313 R9Q
GKVKDNKPQGRMTAYAFFVQTCREEHKKKHPEEQVIFAEFSRKCAERWKTMLDKEKQRFHEMAEKDK
ARYELEMQSYVPPKGAV

>> SEQUÊNCIA 314 R11H
GKVKDNKPRGHMTAYAFFVQTCREEHKKKHPEEQVIFAEFSRKCAERWKTMLDKEKQRFHEMAEKDK

Continuação da figura 4b

ARYELEMQSYVPPKGAV

>> SEQUÊNCIA 315 R11Q

**GKVKDNKPRGQMTAYAFFVQTCREEHKKKHPEEQVIFAEFSRKCAERWKTMLDKEKQRFHEMAEKDK
ARYELEMQSYVPPKGAV**

>> SEQUÊNCIA 316 M12I

**GKVKDNKPRGRITAYAFFVQTCREEHKKKHPEEQVIFAEFSRKCAERWKTMLDKEKQRFHEMAEKDKA
RYELEMQSYVPPKGAV**

>> SEQUÊNCIA 317 M12V

**GKVKDNKPRGRVTAYAFFVQTCREEHKKKHPEEQVIFAEFSRKCAERWKTMLDKEKQRFHEMAEKDK
ARYELEMQSYVPPKGAV**

>> SEQUÊNCIA 318 Y15H

**GKVKDNKPRGRMTAYAFFVQTCREEHKKKHPEEQVIFAEFSRKCAERWKTMLDKEKQRFHEMAEKDK
ARYELEMQSYVPPKGAV**

>> SEQUÊNCIA 319 Y15I

**GKVKDNKPRGRMTAJAFFVQTCREEHKKKHPEEQVIFAEFSRKCAERWKTMLDKEKQRFHEMAEKDKA
RYELEMQSYVPPKGAV**

>> SEQUÊNCIA 320 F17I

**GKVKDNKPRGRMTAYAFVQTCREEHKKKHPEEQVIFAEFSRKCAERWKTMLDKEKQRFHEMAEKDKA
RYELEMQSYVPPKGAV**

>> SEQUÊNCIA 321 F17V

**GKVKDNKPRGRMTAYAVFVQTCREEHKKKHPEEQVIFAEFSRKCAERWKTMLDKEKQRFHEMAEKDK
ARYELEMQSYVPPKGAV**

>> SEQUÊNCIA 322 F18I

**GKVKDNKPRGRMTAYAFIVQTCREEHKKKHPEEQVIFAEFSRKCAERWKTMLDKEKQRFHEMAEKDKA
RYELEMQSYVPPKGAV**

>> SEQUÊNCIA 323 F18V

**GKVKDNKPRGRMTAYAFVVQTCREEHKKKHPEEQVIFAEFSRKCAERWKTMLDKEKQRFHEMAEKDK
ARYELEMQSYVPPKGAV**

>> SEQUÊNCIA 324 R23H

**GKVKDNKPRGRMTAYAFFVQTCHEEHKKKHPEEQVIFAEFSRKCAERWKTMLDKEKQRFHEMAEKDK
ARYELEMQSYVPPKGAV**

>> SEQUÊNCIA 325 R23Q

**GKVKDNKPRGRMTAYAFFVQTCQEEHKKKHPEEQVIFAEFSRKCAERWKTMLDKEKQRFHEMAEKDK
ARYELEMQSYVPPKGAV**

>> SEQUÊNCIA 326 E24Q

**GKVKDNKPRGRMTAYAFFVQTCRQEHKKKHPEEQVIFAEFSRKCAERWKTMLDKEKQRFHEMAEKDK
ARYELEMQSYVPPKGAV**

>> SEQUÊNCIA 327 E24H

**GKVKDNKPRGRMTAYAFFVQTCRNEHKKKHPEEQVIFAEFSRKCAERWKTMLDKEKQRFHEMAEKDK
ARYELEMQSYVPPKGAV**

>> SEQUÊNCIA 328 E24N

Continuação da figura 4b

**GKVKDNKPRGRMTAYAFFVQTCRNEHKKKHPEEQVIFAEFSRKCAERWKTMLDKEKQRFHEMAEKDK
ARYELEMQSYVPPKGAV**

>> SEQUÊNCIA 329 E25Q

**GKVKDNKPRGRMTAYAFFVQTCREQHKKKHPEEQVIFAEFSRKCAERWKTMLDKEKQRFHEMAEKDK
ARYELEMQSYVPPKGAV**

>>: SEQUÊNCIA 330 E25H

**GKVKDNKPRGRMTAYAFFVQTCREHHKKKHPEEQVIFAEFSRKCAERWKTMLDKEKQRFHEMAEKDK
ARYELEMQSYVPPKGAV**

>> SEQUÊNCIA 331 E25N

**GKVKDNKPRGRMTAYAFFVQTCRENHKKKHPEEQVIFAEFSRKCAERWKTMLDKEKQRFHEMAEKDK
ARYELEMQSYVPPKGAV**

>> SEQUÊNCIA 332 K27N

**GKVKDNKPRGRMTAYAFFVQTCREEHNKKHPEEQVIFAEFSRKCAERWKTMLDKEKQRFHEMAEKDK
ARYELEMQSYVPPKGAV**

>> SEQUÊNCIA 333 K27Q

**GKVKDNKPRGRMTAYAFFVQTCREEHQKKHPEEQVIFAEFSRKCAERWKTMLDKEKQRFHEMAEKDK
ARYELEMQSYVPPKGAV**

>>: SEQUÊNCIA 334 K28N

**GKVKDNKPRGRMTAYAFFVQTCREEHKNKHPEEQVIFAEFSRKCAERWKTMLDKEKQRFHEMAEKDK
ARYELEMQSYVPPKGAV**

>> SEQUÊNCIA 335 K28Q

**GKVKDNKPRGRMTAYAFFVQTCREEHKQKHPEEQVIFAEFSRKCAERWKTMLDKEKQRFHEMAEKDK
ARYELEMQSYVPPKGAV**

>> SEQUÊNCIA 336 K29N

**GKVKDNKPRGRMTAYAFFVQTCREEHKKNHPEEQVIFAEFSRKCAERWKTMLDKEKQRFHEMAEKDK
ARYELEMQSYVPPKGAV**

>> SEQUÊNCIA 337 K29Q

**GKVKDNKPRGRMTAYAFFVQTCREEHKKQHPEEQVIFAEFSRKCAERWKTMLDKEKQRFHEMAEKDK
ARYELEMQSYVPPKGAV**

>> SEQUÊNCIA 338 P31A

**GKVKDNKPRGRMTAYAFFVQTCREEHKKKHAEQVIFAEFSRKCAERWKTMLDKEKQRFHEMAEKDK
ARYELEMQSYVPPKGAV**

>>: SEQUÊNCIA 339 P31S

**GKVKDNKPRGRMTAYAFFVQTCREEHKKKHSEEQVIFAEFSRKCAERWKTMLDKEKQRFHEMAEKDK
ARYELEMQSYVPPKGAV**

>> SEQUÊNCIA 340 E32Q

**GKVKDNKPRGRMTAYAFFVQTCREEHKKKHPEEQVIFAEFSRKCAERWKTMLDKEKQRFHEMAEKDK
ARYELEMQSYVPPKGAV**

>> SEQUÊNCIA 341 E32H

GKVKDNKPRGRMTAYAFFVQTCREEHKKKHPEEQVIFAEFSRKCAERWKTMLDKEKQRFHEMAEKDK

Continuação da figura 4b

ARYELEMQSYVPPKGAV

>> SEQUÊNCIA 342 E32N

**GKVKDNKPRGRMTAYAFFVQTCREEHKKKHHPNEQVIFAEFSRKCAERWKTMLDKEKQRFHEMAEKDK
ARYELEMQSYVPPKGAV**

>> SEQUÊNCIA 343 E33Q

**GKVKDNKPRGRMTAYAFFVQTCREEHKKKHPEQVIFAEFSRKCAERWKTMLDKEKQRFHEMAEKDK
ARYELEMQSYVPPKGAV**

>> SEQUÊNCIA 344 E33H

**GKVKDNKPRGRMTAYAFFVQTCREEHKKKHPEHQVIFAEFSRKCAERWKTMLDKEKQRFHEMAEKDK
ARYELEMQSYVPPKGAV**

>> SEQUÊNCIA 345 E33N

**GKVKDNKPRGRMTAYAFFVQTCREEHKKKHHPENQVIFAEFSRKCAERWKTMLDKEKQRFHEMAEKDK
ARYELEMQSYVPPKGAV**

>> SEQUÊNCIA 346 F37I

**GKVKDNKPRGRMTAYAFFVQTCREEHKKKHPEEQVIFAEFSRKCAERWKTMLDKEKQRFHEMAEKDKA
RYELEMQSYVPPKGAV**

>> SEQUÊNCIA 347 F37V

**GKVKDNKPRGRMTAYAFFVQTCREEHKKKHPEEQVIFAEFSRKCAERWKTMLDKEKQRFHEMAEKDK
ARYELEMQSYVPPKGAV**

>> SEQUÊNCIA 348 E39Q

**GKVKDNKPRGRMTAYAFFVQTCREEHKKKHPEEQVIFAQFSRKCAERWKTMLDKEKQRFHEMAEKDK
ARYELEMQSYVPPKGAV**

>> SEQUÊNCIA 349 E39H

**GKVKDNKPRGRMTAYAFFVQTCREEHKKKHPEEQVIFAHFSRKCAERWKTMLDKEKQRFHEMAEKDK
ARYELEMQSYVPPKGAV**

>> SEQUÊNCIA 350 E39N

**GKVKDNKPRGRMTAYAFFVQTCREEHKKKHPEEQVIFANFSRKCAERWKTMLDKEKQRFHEMAEKDK
ARYELEMQSYVPPKGAV**

>> SEQUÊNCIA 351 F40I

**GKVKDNKPRGRMTAYAFFVQTCREEHKKKHPEEQVIFAEISRKAERWKTMLDKEKQRFHEMAEKDKA
RYELEMQSYVPPKGAV**

>> SEQUÊNCIA 352 F40V

**GKVKDNKPRGRMTAYAFFVQTCREEHKKKHPEEQVIFAEVSRKAERWKTMLDKEKQRFHEMAEKDK
ARYELEMQSYVPPKGAV**

>> SEQUÊNCIA 353 R42H

**GKVKDNKPRGRMTAYAFFVQTCREEHKKKHPEEQVIFAEFSHKCAERWKTMLDKEKQRFHEMAEKDK
ARYELEMQSYVPPKGAV**

>> SEQUÊNCIA 354 R42Q

**GKVKDNKPRGRMTAYAFFVQTCREEHKKKHPEEQVIFAEFSQKCAERWKTMLDKEKQRFHEMAEKDK
ARYELEMQSYVPPKGAV**

>> SEQUÊNCIA 355 K43N

Continuação da figura 4b

GKVKDNKPRGRMTAYAFFVQTCREEHKKKHPEEQVIFAEFSRNCAERWKTMLDKEKQRFHEMAEKDK
ARYELEMQSYVPPKGAV

>> SEQUÊNCIA 356 K43Q

GKVKDNKPRGRMTAYAFFVQTCREEHKKKHPEEQVIFAEFSRQCAERWKTMLDKEKQRFHEMAEKDK
ARYELEMQSYVPPKGAV

>> SEQUÊNCIA 357 E46Q

GKVKDNKPRGRMTAYAFFVQTCREEHKKKHPEEQVIFAEFSRKCAQRWKTMLDKEKQRFHEMAEKDK
ARYELEMQSYVPPKGAV

>> SEQUÊNCIA 358 E46H

GKVKDNKPRGRMTAYAFFVQTCREEHKKKHPEEQVIFAEFSRKCAHRWKTMLDKEKQRFHEMAEKDK
ARYELEMQSYVPPKGAV

>> SEQUÊNCIA 359 E46N

GKVKDNKPRGRMTAYAFFVQTCREEHKKKHPEEQVIFAEFSRKCANRWKTMLDKEKQRFHEMAEKDK
ARYELEMQSYVPPKGAV

>> SEQUÊNCIA 360 R47H

GKVKDNKPRGRMTAYAFFVQTCREEHKKKHPEEQVIFAEFSRKCAEHWKTMLDKEKQRFHEMAEKDK
ARYELEMQSYVPPKGAV

>> SEQUÊNCIA 361 R47Q

GKVKDNKPRGRMTAYAFFVQTCREEHKKKHPEEQVIFAEFSRKCAEQWKTMLDKEKQRFHEMAEKDK
ARYELEMQSYVPPKGAV

>> SEQUÊNCIA 362 W48Y

GKVKDNKPRGRMTAYAFFVQTCREEHKKKHPEEQVIFAEFSRKCAERYKTMLDKEKQRFHEMAEKDK
ARYELEMQSYVPPKGAV

>> SEQUÊNCIA 363 W48S

GKVKDNKPRGRMTAYAFFVQTCREEHKKKHPEEQVIFAEFSRKCAERSKTMLDKEKQRFHEMAEKDK
ARYELEMQSYVPPKGAV

>> SEQUÊNCIA 364 K49N

GKVKDNKPRGRMTAYAFFVQTCREEHKKKHPEEQVIFAEFSRKCAERWNTMLDKEKQRFHEMAEKDK
ARYELEMQSYVPPKGAV

>> SEQUÊNCIA 365 K49Q

GKVKDNKPRGRMTAYAFFVQTCREEHKKKHPEEQVIFAEFSRKCAERWQTMLDKEKQRFHEMAEKDK
ARYELEMQSYVPPKGAV

>> SEQUÊNCIA 366 M51I

GKVKDNKPRGRMTAYAFFVQTCREEHKKKHPEEQVIFAEFSRKCAERWKTILDKEKQRFHEMAEKDKA
RYELEMQSYVPPKGAV

>> SEQUÊNCIA 367 M51V

GKVKDNKPRGRMTAYAFFVQTCREEHKKKHPEEQVIFAEFSRKCAERWKTVLDKEKQRFHEMAEKDK
ARYELEMQSYVPPKGAV

>>> SEQUÊNCIA 368 L52I

GKVKDNKPRGRMTAYAFFVQTCREEHKKKHPEEQVIFAEFSRKCAERWKTMDKEKQRFHEMAEKDKA
RYELEMQSYVPPKGAV

Continuação da figura 4b

>> SEQUÊNCIA 369 L52V

GKVKDNKPRGRMTAYAFFVQTCREEHKKKHPEEQVIFAEFSRKCAERWKTMDKEKQRFHEMAEKDK
ARYELEMQSYVPPKGAV

>> SEQUÊNCIA 370 D53N

GKVKDNKPRGRMTAYAFFVQTCREEHKKKHPEEQVIFAEFSRKCAERWKTMLNKEKQRFHEMAEKDK
ARYELEMQSYVPPKGAV

>> SEQUÊNCIA 371 D53Q

GKVKDNKPRGRMTAYAFFVQTCREEHKKKHPEEQVIFAEFSRKCAERWKTMLQKEKQRFHEMAEKDK
ARYELEMQSYVPPKGAV

>> SEQUÊNCIA 372 K54N

GKVKDNKPRGRMTAYAFFVQTCREEHKKKHPEEQVIFAEFSRKCAERWKTMLDNEKQRFHEMAEKDK
ARYELEMQSYVPPKGAV

>> SEQUÊNCIA 373 K54Q

GKVKDNKPRGRMTAYAFFVQTCREEHKKKHPEEQVIFAEFSRKCAERWKTMLDQEKQRFHEMAEKDK
ARYELEMQSYVPPKGAV

>> SEQUÊNCIA 374 E55Q

GKVKDNKPRGRMTAYAFFVQTCREEHKKKHPEEQVIFAEFSRKCAERWKTMLDKQKQRFHEMAEKDK
ARYELEMQSYVPPKGAV

>> SEQUÊNCIA 375 E55H

GKVKDNKPRGRMTAYAFFVQTCREEHKKKHPEEQVIFAEFSRKCAERWKTMLDKHKQRFHEMAEKDK
ARYELEMQSYVPPKGAV

>> SEQUÊNCIA 376 E55N

GKVKDNKPRGRMTAYAFFVQTCREEHKKKHPEEQVIFAEFSRKCAERWKTMLDKNKQRFHEMAEKDK
ARYELEMQSYVPPKGAV

>> SEQUÊNCIA 377 K56N

GKVKDNKPRGRMTAYAFFVQTCREEHKKKHPEEQVIFAEFSRKCAERWKTMLDKNQRFHEMAEKDK
ARYELEMQSYVPPKGAV

>> SEQUÊNCIA 378 K56Q

GKVKDNKPRGRMTAYAFFVQTCREEHKKKHPEEQVIFAEFSRKCAERWKTMLDKEQRFHEMAEKDK
ARYELEMQSYVPPKGAV

>> SEQUÊNCIA 379 R58H

GKVKDNKPRGRMTAYAFFVQTCREEHKKKHPEEQVIFAEFSRKCAERWKTMLDKEKQHFHEMAEKDK
ARYELEMQSYVPPKGAV

>> SEQUÊNCIA 380 R58Q

GKVKDNKPRGRMTAYAFFVQTCREEHKKKHPEEQVIFAEFSRKCAERWKTMLDKEKQQFHEMAEKDK
ARYELEMQSYVPPKGAV

>> SEQUÊNCIA 381 F59I

GKVKDNKPRGRMTAYAFFVQTCREEHKKKHPEEQVIFAEFSRKCAERWKTMLDKEKQRIHEMAEKDKA
RYELEMQSYVPPKGAV

>> SEQUÊNCIA 382 F59V

GKVKDNKPRGRMTAYAFFVQTCREEHKKKHPEEQVIFAEFSRKCAERWKTMLDKEKQRVHEMAEKDK
ARYELEMQSYVPPKGAV

Continuação da figura 4b

>> SEQUÊNCIA 383 E61Q

GKVKDNKPRGRMTAYAFFVQTCREEHKKKHPEEQVIFAEFSRKCAERWKTMLDKEKQRFHQMAEKDK
ARYELEMQSYVPPKGAV

>> SEQUÊNCIA 384 E61H

GKVKDNKPRGRMTAYAFFVQTCREEHKKKHPEEQVIFAEFSRKCAERWKTMLDKEKQRFHHMAEKDK
ARYELEMQSYVPPKGAV

>> SEQUÊNCIA 385 E61N

GKVKDNKPRGRMTAYAFFVQTCREEHKKKHPEEQVIFAEFSRKCAERWKTMLDKEKQRFHNMAEKDK
ARYELEMQSYVPPKGAV

>> SEQUÊNCIA 386 M62I

GKVKDNKPRGRMTAYAFFVQTCREEHKKKHPEEQVIFAEFSRKCAERWKTMLDKEKQRFHEIAEKDKA
RYELEMQSYVPPKGAV

>> SEQUÊNCIA 387 M62V

GKVKDNKPRGRMTAYAFFVQTCREEHKKKHPEEQVIFAEFSRKCAERWKTMLDKEKQRFHEVAEKDK
ARYELEMQSYVPPKGAV

>> SEQUÊNCIA 388 E64Q

GKVKDNKPRGRMTAYAFFVQTCREEHKKKHPEEQVIFAEFSRKCAERWKTMLDKEKQRFHEMAQDKK
ARYELEMQSYVPPKGAV

>> SEQUÊNCIA 389 E64H

GKVKDNKPRGRMTAYAFFVQTCREEHKKKHPEEQVIFAEFSRKCAERWKTMLDKEKQRFHEMAHKDK
ARYELEMQSYVPPKGAV

>> SEQUÊNCIA 390 E64N

GKVKDNKPRGRMTAYAFFVQTCREEHKKKHPEEQVIFAEFSRKCAERWKTMLDKEKQRFHEMANKDK
ARYELEMQSYVPPKGAV

>> SEQUÊNCIA 391 K65N

GKVKDNKPRGRMTAYAFFVQTCREEHKKKHPEEQVIFAEFSRKCAERWKTMLDKEKQRFHEMAENDK
ARYELEMQSYVPPKGAV

>> SEQUÊNCIA 392 K65Q

GKVKDNKPRGRMTAYAFFVQTCREEHKKKHPEEQVIFAEFSRKCAERWKTMLDKEKQRFHEMAEQDK
ARYELEMQSYVPPKGAV

>> SEQUÊNCIA 393 D66N

GKVKDNKPRGRMTAYAFFVQTCREEHKKKHPEEQVIFAEFSRKCAERWKTMLDKEKQRFHEMAEKNK
ARYELEMQSYVPPKGAV

>> SEQUÊNCIA 394 D66Q

GKVKDNKPRGRMTAYAFFVQTCREEHKKKHPEEQVIFAEFSRKCAERWKTMLDKEKQRFHEMAEKQK
ARYELEMQSYVPPKGAV

>> SEQUÊNCIA 395 K67N

GKVKDNKPRGRMTAYAFFVQTCREEHKKKHPEEQVIFAEFSRKCAERWKTMLDKEKQRFHEMAEKDN
ARYELEMQSYVPPKGAV

>> SEQUÊNCIA 396 K67Q

GKVKDNKPRGRMTAYAFFVQTCREEHKKKHPEEQVIFAEFSRKCAERWKTMLDKEKQRFHEMAEKDQ

Continuação da figura 4b

ARYELEMQSYVPPKGAV

>> SEQUÊNCIA 397 R69H

**GKVKDNKPRGRMTAYAFFVQTCREEHKKKHPEEQVIFAEFSRKCAERWKTMLDKEKQRFHEMAEKDK
AHYELEMQSYVPPKGAV**

>> SEQUÊNCIA 398 R69Q

**GKVKDNKPRGRMTAYAFFVQTCREEHKKKHPEEQVIFAEFSRKCAERWKTMLDKEKQRFHEMAEKDK
AQYELEMQSYVPPKGAV**

>> SEQUÊNCIA 399 Y70H

**GKVKDNKPRGRMTAYAFFVQTCREEHKKKHPEEQVIFAEFSRKCAERWKTMLDKEKQRFHEMAEKDK
ARHELEMQSYVPPKGAV**

>> SEQUÊNCIA 400 Y70I

**GKVKDNKPRGRMTAYAFFVQTCREEHKKKHPEEQVIFAEFSRKCAERWKTMLDKEKQRFHEMAEKDK
ARIELEMQSYV**

>> SEQUÊNCIA 401 E71Q

**GKVKDNKPRGRMTAYAFFVQTCREEHKKKHPEEQVIFAEFSRKCAERWKTMLDKEKQRFHEMAEKDK
ARYQLEMQSYVPPKGAV**

>> SEQUÊNCIA 402 E71H

**GKVKDNKPRGRMTAYAFFVQTCREEHKKKHPEEQVIFAEFSRKCAERWKTMLDKEKQRFHEMAEKDK
ARYHLEMQSYVPPKGAV**

>> SEQUÊNCIA 403 E71N

**GKVKDNKPRGRMTAYAFFVQTCREEHKKKHPEEQVIFAEFSRKCAERWKTMLDKEKQRFHEMAEKDK
ARYNLEMQSYVPPKGAV**

>> SEQUÊNCIA 404 L72I

**GKVKDNKPRGRMTAYAFFVQTCREEHKKKHPEEQVIFAEFSRKCAERWKTMLDKEKQRFHEMAEKDK
ARYEIEMQSYVPPKGAV**

>> SEQUÊNCIA 405 L72V

**GKVKDNKPRGRMTAYAFFVQTCREEHKKKHPEEQVIFAEFSRKCAERWKTMLDKEKQRFHEMAEKDK
ARYEVEMQSYVPPKGAV**

>> SEQUÊNCIA 406 E73Q

**GKVKDNKPRGRMTAYAFFVQTCREEHKKKHPEEQVIFAEFSRKCAERWKTMLDKEKQRFHEMAEKDK
ARYELQMQSYVPPKGAV**

>> SEQUÊNCIA 407 E73H

**GKVKDNKPRGRMTAYAFFVQTCREEHKKKHPEEQVIFAEFSRKCAERWKTMLDKEKQRFHEMAEKDK
ARYELHMQSYVPPKGAV**

>> SEQUÊNCIA 408 E73N

**GKVKDNKPRGRMTAYAFFVQTCREEHKKKHPEEQVIFAEFSRKCAERWKTMLDKEKQRFHEMAEKDK
ARYELNMQSYVPPKGAV**

>> SEQUÊNCIA 409 M74I

**GKVKDNKPRGRMTAYAFFVQTCREEHKKKHPEEQVIFAEFSRKCAERWKTMLDKEKQRFHEMAEKDK
ARYELEIQSYVPPKGAV**

>> SEQUÊNCIA 410 M74V

GKVKDNKPRGRMTAYAFFVQTCREEHKKKHPEEQVIFAEFSRKCAERWKTMLDKEKQRFHEMAEKDK

Continuação da figura 4b

ARYELEVQSYVPPKGAV

>> SEQUÊNCIA 411 Y77H

**GKVKDNKPRGRMTAYAFFVQTCREEHKKKHPEEQVIFAEFSRKCAERWKTMLDKEKQRFHEMAEKDK
ARYELEMQSHVPPKGAV**

>> SEQUÊNCIA 412 Y77I

**GKVKDNKPRGRMTAYAFFVQTCREEHKKKHPEEQVIFAEFSRKCAERWKTMLDKEKQRFHEMAEKDK
ARYELEMQSYVPPKGAV**

>> SEQUÊNCIA 413 P79A

**GKVKDNKPRGRMTAYAFFVQTCREEHKKKHPEEQVIFAEFSRKCAERWKTMLDKEKQRFHEMAEKDK
ARYELEMQSYVAPKGAV**

>> SEQUÊNCIA 414 P79S

**GKVKDNKPRGRMTAYAFFVQTCREEHKKKHPEEQVIFAEFSRKCAERWKTMLDKEKQRFHEMAEKDK
ARYELEMQSYVSPKGAV**

>> SEQUÊNCIA 415 P80A

**GKVKDNKPRGRMTAYAFFVQTCREEHKKKHPEEQVIFAEFSRKCAERWKTMLDKEKQRFHEMAEKDK
ARYELEMQSYVPAKGAV**

>> SEQUÊNCIA 416 P80S

**GKVKDNKPRGRMTAYAFFVQTCREEHKKKHPEEQVIFAEFSRKCAERWKTMLDKEKQRFHEMAEKDK
ARYELEMQSYVPSKGAV**

>> SEQUÊNCIA 417 K81N

**GKVKDNKPRGRMTAYAFFVQTCREEHKKKHPEEQVIFAEFSRKCAERWKTMLDKEKQRFHEMAEKDK
ARYELEMQSYVPPNGAV**

>> SEQUÊNCIA 418 K81Q

**GKVKDNKPRGRMTAYAFFVQTCREEHKKKHPEEQVIFAEFSRKCAERWKTMLDKEKQRFHEMAEKDK
ARYELEMQSYVPPQGAV**

Figura 5a

77 aminoácidos de Box A de HMGB1 de Anopheles gambia (XP_311154)

Protecção contra proteólise
Se a sequência:

**PRGRMTAYAFFVQTCREEHKKKHPEEQVIFAEFSRKCAERWKTMLDKEKQRFHEMA
EKDKARYELEMQSYVPPKGAV**

A negrito aminoácidos sensíveis a proteólise por proteases

Figura 5b

77 aminoácidos de Box A de HMGB1 de Anopheles gambia (XP_311154)

Lista de mutantes:

P1A	E26N	R51Q	P73A
P1S	F30I	F52I	P73S
R2H	F30V	F52V	K74N
R2Q	E32Q	E54Q	K74Q
R4H	E32H	E54H	
R4Q	E32N	E54N	
M5I	F33I	M55I	
M5V	F33V	M55V	
Y8H	R35H	E57Q	
Y8I	R35Q	E57H	
F10I	K36N	E57N	
F10V	K36Q	K58N	
F11I	E39Q	K58Q	
F11V	E39H	D59N	
R16H	E39N	D59Q	
R16Q	R40H	K60N	
E17Q	R40Q	K60Q	
E17H	W41Y	R62H	
E17N	W41S	R62Q	
E18Q	K42N	Y63H	
E18H	K42Q	Y63I	
E18N	M44I	E64Q	
K20N	M44V	E64H	
K20Q	L45I	E64N	
K21N	L45V	L65I	
K21Q	D46N	L65V	
K22N	D46Q	E66Q	
K22Q	K47N	E66H	
P24A	K47Q	E68N	
P24S	E48Q	M67I	
E25Q	E48H	M67V	
E25H	E48N	Y70H	
E25N	K49N	Y70I	
E26Q	K49Q	P72A	
E26H	R51H	P72S	

Continuação da figura 5b

> SEQUÊNCIA 419 Natural

**PRGRMTAYAFFVQTCREEHKKKHPEEQVIFAEFSRKCAERWKTMLDKEKQRFHEMAEKDKARYELEM
QSYVPPKGAV**

>> SEQUÊNCIA 420 P1A

**ARGRMTAYAFFVQTCREEHKKKHPEEQVIFAEFSRKCAERWKTMLDKEKQRFHEMAEKDKARYELEM
QSYVPPKGAV**

> SEQUÊNCIA 421 P1S

**SRGRMTAYAFFVQTCREEHKKKHPEEQVIFAEFSRKCAERWKTMLDKEKQRFHEMAEKDKARYELEM
QSYVPPKGAV**

> SEQUÊNCIA 422 R2H

**PHGRMTAYAFFVQTCREEHKKKHPEEQVIFAEFSRKCAERWKTMLDKEKQRFHEMAEKDKARYELEM
QSYVPPKGAV**

> SEQUÊNCIA 423 R2Q

**PQGRMTAYAFFVQTCREEHKKKHPEEQVIFAEFSRKCAERWKTMLDKEKQRFHEMAEKDKARYELEM
QSYVPPKGAV**

> SEQUÊNCIA 424 R4H

**PRGHMTAYAFFVQTCREEHKKKHPEEQVIFAEFSRKCAERWKTMLDKEKQRFHEMAEKDKARYELEM
QSYVPPKGAV**

> SEQUÊNCIA 425 R4Q

**PRGQMTAYAFFVQTCREEHKKKHPEEQVIFAEFSRKCAERWKTMLDKEKQRFHEMAEKDKARYELEM
QSYVPPKGAV**

> SEQUÊNCIA 426 M5I

**PRGRITAYAFFVQTCREEHKKKHPEEQVIFAEFSRKCAERWKTMLDKEKQRFHEMAEKDKARYELEM
QSYVPPKGAV**

> SEQUÊNCIA 427 M5V

**PRGRVTAYAFFVQTCREEHKKKHPEEQVIFAEFSRKCAERWKTMLDKEKQRFHEMAEKDKARYELEM
QSYVPPKGAV**

> SEQUÊNCIA 428 Y8H

**PRGRMTAHAFVQTCREEHKKKHPEEQVIFAEFSRKCAERWKTMLDKEKQRFHEMAEKDKARYELEM
QSYVPPKGAV**

> SEQUÊNCIA 429 Y8I

**PRGRMTAIAFFVQTCREEHKKKHPEEQVIFAEFSRKCAERWKTMLDKEKQRFHEMAEKDKARYELEM
QSYVPPKGAV**

> SEQUÊNCIA 430 F10I

**PRGRMTAYAFVQTCREEHKKKHPEEQVIFAEFSRKCAERWKTMLDKEKQRFHEMAEKDKARYELEM
QSYVPPKGAV**

> SEQUÊNCIA 431 F10V

**PRGRMTAYAVFVQTCREEHKKKHPEEQVIFAEFSRKCAERWKTMLDKEKQRFHEMAEKDKARYELEM
QSYVPPKGAV**

Continuação da figura 5b

- > SEQUÊNCIA 432 F11I
PRGRMTAYAFIVQTCREEHKKKHPEEQVIFAEFSRKCAERWKTMLDKEKQRFHEMAEKDKARYELEM
SYVPPKGAV
- > SEQUÊNCIA 433 F11V
PRGRMTAYAFVVQTCREEHKKKHPEEQVIFAEFSRKCAERWKTMLDKEKQRFHEMAEKDKARYELEM
QSYVPPKGAV
- > SEQUÊNCIA 434 R16H
PRGRMTAYAFFVQTCREEHKKKHPEEQVIFAEFSRKCAERWKTMLDKEKQRFHEMAEKDKARYELEM
QSYVPPKGAV
- > SEQUÊNCIA 435 R16Q
PRGRMTAYAFFVQTCQEEHKKKHPEEQVIFAEFSRKCAERWKTMLDKEKQRFHEMAEKDKARYELEM
QSYVPPKGAV
- > SEQUÊNCIA 436 E17Q
PRGRMTAYAFFVQTCRQEHKKKHPEEQVIFAEFSRKCAERWKTMLDKEKQRFHEMAEKDKARYELEM
QSYVPPKGAV
- > SEQUÊNCIA 437 E17H
PRGRMTAYAFFVQTCRHEHKKKHPEEQVIFAEFSRKCAERWKTMLDKEKQRFHEMAEKDKARYELEM
QSYVPPKGAV
- > SEQUÊNCIA 438 E17N
PRGRMTAYAFFVQTCRNEHKKKHPEEQVIFAEFSRKCAERWKTMLDKEKQRFHEMAEKDKARYELEM
QSYVPPKGAV
- > SEQUÊNCIA 439 E18Q
PRGRMTAYAFFVQTCREQHKKKHPEEQVIFAEFSRKCAERWKTMLDKEKQRFHEMAEKDKARYELEM
QSYVPPKGAV
- > SEQUÊNCIA 440 E18H
PRGRMTAYAFFVQTCREHHKKKHPEEQVIFAEFSRKCAERWKTMLDKEKQRFHEMAEKDKARYELEM
QSYVPPKGAV
- > SEQUÊNCIA 441 E18N
PRGRMTAYAFFVQTCRENHKKKHPEEQVIFAEFSRKCAERWKTMLDKEKQRFHEMAEKDKARYELEM
QSYVPPKGAV
- > SEQUÊNCIA 442 K20N
PRGRMTAYAFFVQTCREEHNKKKHPEEQVIFAEFSRKCAERWKTMLDKEKQRFHEMAEKDKARYELEM
QSYVPPKGAV
- > SEQUÊNCIA 443 K20Q
PRGRMTAYAFFVQTCREEHQKKKHPEEQVIFAEFSRKCAERWKTMLDKEKQRFHEMAEKDKARYELEM
QSYVPPKGAV
- > SEQUÊNCIA 444 K21N
PRGRMTAYAFFVQTCREEHKNKHPEEQVIFAEFSRKCAERWKTMLDKEKQRFHEMAEKDKARYELEM
QSYVPPKGAV
- > SEQUÊNCIA 445 K21Q
PRGRMTAYAFFVQTCREEHKQKHPEEQVIFAEFSRKCAERWKTMLDKEKQRFHEMAEKDKARYELEM
QSYVPPKGAV

Continuação da figura 5b

- > SEQUÊNCIA 446 K22N
PRGRMTAYAFFVQTCREEHKKNHPEEQVIFAEFSRKCAERWKTMLDKEKQRFHEMAEKDKARYELEM
QSYVPPKGAV
- > SEQUÊNCIA 447 K22Q
PRGRMTAYAFFVQTCREEHKKQHPEEQVIFAEFSRKCAERWKTMLDKEKQRFHEMAEKDKARYELEM
QSYVPPKGAV
- > SEQUÊNCIA 448 P24A
PRGRMTAYAFFVQTCREEHKKKHAEQVIFAEFSRKCAERWKTMLDKEKQRFHEMAEKDKARYELEM
QSYVPPKGAV
- > SEQUÊNCIA 449 P24S
PRGRMTAYAFFVQTCREEHKKKHSEEQVIFAEFSRKCAERWKTMLDKEKQRFHEMAEKDKARYELEM
QSYVPPKGAV
- > SEQUÊNCIA 450 E25Q
PRGRMTAYAFFVQTCREEHKKKHPEEQVIFAEFSRKCAERWKTMLDKEKQRFHEMAEKDKARYELEM
QSYVPPKGAV
- > SEQUÊNCIA 451 E25H
PRGRMTAYAFFVQTCREEHKKKHPEEQVIFAEFSRKCAERWKTMLDKEKQRFHEMAEKDKARYELEM
QSYVPPKGAV
- > SEQUÊNCIA 452 E25N
PRGRMTAYAFFVQTCREEHKKKHPEEQVIFAEFSRKCAERWKTMLDKEKQRFHEMAEKDKARYELEM
QSYVPPKGAV
- > SEQUÊNCIA 453 E26Q
PRGRMTAYAFFVQTCREEHKKKHPEEQVIFAEFSRKCAERWKTMLDKEKQRFHEMAEKDKARYELEM
QSYVPPKGAV
- > SEQUÊNCIA 454 E26H
PRGRMTAYAFFVQTCREEHKKKHPEHQVIFAEFSRKCAERWKTMLDKEKQRFHEMAEKDKARYELEM
QSYVPPKGAV
- > SEQUÊNCIA 455 E26N
PRGRMTAYAFFVQTCREEHKKKHPEQVIFAEFSRKCAERWKTMLDKEKQRFHEMAEKDKARYELEM
QSYVPPKGAV
- > SEQUÊNCIA 456 F30I
PRGRMTAYAFFVQTCREEHKKKHPEEQVIFAEFSRKCAERWKTMLDKEKQRFHEMAEKDKARYELEM
QSYVPPKGAV
- > SEQUÊNCIA 457 F30V
PRGRMTAYAFFVQTCREEHKKKHPEEQVIFAEFSRKCAERWKTMLDKEKQRFHEMAEKDKARYELEM
QSYVPPKGAV
- > SEQUÊNCIA 458 E32Q
PRGRMTAYAFFVQTCREEHKKKHPEEQVIFAEFSRKCAERWKTMLDKEKQRFHEMAEKDKARYELEM
QSYVPPKGAV
- > SEQUÊNCIA 459 E32H
PRGRMTAYAFFVQTCREEHKKKHPEEQVIFAEFSRKCAERWKTMLDKEKQRFHEMAEKDKARYELEM
QSYVPPKGAV

Continuação da figura 5b

- > . SEQUÊNCIA 460 E32N
PRGRMTAYAFFVQTCREEHKKKHPEEQVIFANFSRKCAERWKTMLDKEKQRFHEMAEKDKARYELEM
QSYVPPKGAV
- > SEQUÊNCIA 461 F33I
PRGRMTAYAFFVQTCREEHKKKHPEEQVIFAEISRKCAERWKTMLDKEKQRFHEMAEKDKARYELEM
QSYVPPKGAV
- > ! SEQUÊNCIA 462 F33V
PRGRMTAYAFFVQTCREEHKKKHPEEQVIFAEVSRKCAERWKTMLDKEKQRFHEMAEKDKARYELEM
QSYVPPKGAV
- > SEQUÊNCIA 463 R35H
PRGRMTAYAFFVQTCREEHKKKHPEEQVIFAEFSHKCAERWKTMLDKEKQRFHEMAEKDKARYELEM
QSYVPPKGAV
- > SEQUÊNCIA 464 R35Q
PRGRMTAYAFFVQTCREEHKKKHPEEQVIFAEFSQKCAERWKTMLDKEKQRFHEMAEKDKARYELEM
QSYVPPKGAV
- > SEQUÊNCIA 465 K36N
PRGRMTAYAFFVQTCREEHKKKHPEEQVIFAEFSRNCAERWKTMLDKEKQRFHEMAEKDKARYELEM
QSYVPPKGAV
- > SEQUÊNCIA 466 K36Q
PRGRMTAYAFFVQTCREEHKKKHPEEQVIFAEFSRQCAERWKTMLDKEKQRFHEMAEKDKARYELEM
QSYVPPKGAV
- > SEQUÊNCIA 467 E39Q
PRGRMTAYAFFVQTCREEHKKKHPEEQVIFAEFSRKCAQRWKTMLDKEKQRFHEMAEKDKARYELEM
QSYVPPKGAV
- > SEQUÊNCIA 468 E39H
PRGRMTAYAFFVQTCREEHKKKHPEEQVIFAEFSRKCAHRWKTMLDKEKQRFHEMAEKDKARYELEM
QSYVPPKGAV
- > SEQUÊNCIA 469 E39N
PRGRMTAYAFFVQTCREEHKKKHPEEQVIFAEFSRKCANRWKTMLDKEKQRFHEMAEKDKARYELEM
QSYVPPKGAV
- > SEQUÊNCIA 470 R40H
PRGRMTAYAFFVQTCREEHKKKHPEEQVIFAEFSRKCAEHWKTMLDKEKQRFHEMAEKDKARYELEM
QSYVPPKGAV
- > SEQUÊNCIA 471 R40Q
PRGRMTAYAFFVQTCREEHKKKHPEEQVIFAEFSRKCAEQWKTMLDKEKQRFHEMAEKDKARYELEM
QSYVPPKGAV
- > . SEQUÊNCIA 472 W41Y
PRGRMTAYAFFVQTCREEHKKKHPEEQVIFAEFSRKCAERYKTMLDKEKQRFHEMAEKDKARYELEM
QSYVPPKGAV
- > SEQUÊNCIA 473 W41S

Continuação da figura 5b

**PRGRMTAYAFFVQTCREEHKKKHPEEQVIFAEFSRKCAERSKTMLDKEKQRFHEMAEKDKARYELEM
QSYVPPKGAV**

> SEQUÊNCIA 474 K42N

**PRGRMTAYAFFVQTCREEHKKKHPEEQVIFAEFSRKCAERWNTMLDKEKQRFHEMAEKDKARYELEM
QSYVPPKGAV**

> SEQUÊNCIA 475 K42Q

**PRGRMTAYAFFVQTCREEHKKKHPEEQVIFAEFSRKCAERWQTMLDKEKQRFHEMAEKDKARYELEM
QSYVPPKGAV**

> SEQUÊNCIA 476 M44I

**PRGRMTAYAFFVQTCREEHKKKHPEEQVIFAEFSRKCAERWKTILDKEKQRFHEMAEKDKARYELEM
QSYVPPKGAV**

> SEQUÊNCIA 477M44V

**PRGRMTAYAFFVQTCREEHKKKHPEEQVIFAEFSRKCAERWKTVLDKEKQRFHEMAEKDKARYELEM
QSYVPPKGAV**

> SEQUÊNCIA 478 L45I

**PRGRMTAYAFFVQTCREEHKKKHPEEQVIFAEFSRKCAERWKTMDKEKQRFHEMAEKDKARYELEM
QSYVPPKGAV**

> SEQUÊNCIA 479 L45V

**PRGRMTAYAFFVQTCREEHKKKHPEEQVIFAEFSRKCAERWKTMDKEKQRFHEMAEKDKARYELEM
QSYVPPKGAV**

> SEQUÊNCIA 480 D46N

**PRGRMTAYAFFVQTCREEHKKKHPEEQVIFAEFSRKCAERWKTMLNKEKQRFHEMAEKDKARYELEM
QSYVPPKGAV**

> SEQUÊNCIA 481 D46Q

**PRGRMTAYAFFVQTCREEHKKKHPEEQVIFAEFSRKCAERWKTMLQKEKQRFHEMAEKDKARYELEM
QSYVPPKGAV**

> SEQUÊNCIA 482 K47N

**PRGRMTAYAFFVQTCREEHKKKHPEEQVIFAEFSRKCAERWKTMLDNEKQRFHEMAEKDKARYELEM
QSYVPPKGAV**

> SEQUÊNCIA 483 K47Q

**PRGRMTAYAFFVQTCREEHKKKHPEEQVIFAEFSRKCAERWKTMLDQEKQRFHEMAEKDKARYELEM
QSYVPPKGAV**

> SEQUÊNCIA 484 E48Q

**PRGRMTAYAFFVQTCREEHKKKHPEEQVIFAEFSRKCAERWKTMLDKQKQRFHEMAEKDKARYELEM
QSYVPPKGAV**

> SEQUÊNCIA 485 E48H

**PRGRMTAYAFFVQTCREEHKKKHPEEQVIFAEFSRKCAERWKTMLDKHKQRFHEMAEKDKARYELEM
QSYVPPKGAV**

> SEQUÊNCIA 486 E48N

**PRGRMTAYAFFVQTCREEHKKKHPEEQVIFAEFSRKCAERWKTMLDKNKQRFHEMAEKDKARYELEM
QSYVPPKGAV**

Continuação da figura 5b

- > SEQUÊNCIA 487 K49N
PRGRMTAYAFFVQTCREEHKKKHPEEQVIFAEFSRKCAERWKTMLDKENQRFHEMAEKDKARYELEM
QSYVPPKGAV
- > SEQUÊNCIA 488 K49Q
PRGRMTAYAFFVQTCREEHKKKHPEEQVIFAEFSRKCAERWKTMLDKEQQRHEMAEKDKARYELEM
QSYVPPKGAV
- > SEQUÊNCIA 489 R51H
PRGRMTAYAFFVQTCREEHKKKHPEEQVIFAEFSRKCAERWKTMLDKEKQHFHEMAEKDKARYELEM
QSYVPPKGAV
- > SEQUÊNCIA 490 R51Q
PRGRMTAYAFFVQTCREEHKKKHPEEQVIFAEFSRKCAERWKTMLDKEKQQFHEMAEKDKARYELEM
QSYVPPKGAV
- > SEQUÊNCIA 491 F52I
PRGRMTAYAFFVQTCREEHKKKHPEEQVIFAEFSRKCAERWKTMLDKEKQRIHEMAEKDKARYELEM
QSYVPPKGAV
- > SEQUÊNCIA 492 F52V
PRGRMTAYAFFVQTCREEHKKKHPEEQVIFAEFSRKCAERWKTMLDKEKQRVHEMAEKDKARYELEM
QSYVPPKGAV
- > SEQUÊNCIA 493 E54Q
PRGRMTAYAFFVQTCREEHKKKHPEEQVIFAEFSRKCAERWKTMLDKEKQRFHQMAEKDKARYELEM
QSYVPPKGAV
- > SEQUÊNCIA 494 E54H
PRGRMTAYAFFVQTCREEHKKKHPEEQVIFAEFSRKCAERWKTMLDKEKQRFHHMAEKDKARYELEM
QSYVPPKGAV
- > SEQUÊNCIA 495 E54N
PRGRMTAYAFFVQTCREEHKKKHPEEQVIFAEFSRKCAERWKTMLDKEKQRFHNMAEKDKARYELEM
QSYVPPKGAV
- > SEQUÊNCIA 496 M55I
PRGRMTAYAFFVQTCREEHKKKHPEEQVIFAEFSRKCAERWKTMLDKEKQRFHEIAEKDKARYELEM
QSYVPPKGAV
- > SEQUÊNCIA 497 M55V
PRGRMTAYAFFVQTCREEHKKKHPEEQVIFAEFSRKCAERWKTMLDKEKQRFHEVAEKDKARYELEM
QSYVPPKGAV
- > SEQUÊNCIA 498 E57Q
PRGRMTAYAFFVQTCREEHKKKHPEEQVIFAEFSRKCAERWKTMLDKEKQRFHEMAQKDKARYELEM
QSYVPPKGAV
- > SEQUÊNCIA 499 E57H
PRGRMTAYAFFVQTCREEHKKKHPEEQVIFAEFSRKCAERWKTMLDKEKQRFHEMAHKDKARYELEM
QSYVPPKGAV
- > SEQUÊNCIA 500 E57N
PRGRMTAYAFFVQTCREEHKKKHPEEQVIFAEFSRKCAERWKTMLDKEKQRFHEMANKDKARYELEM
QSYVPPKGAV

Continuação da figura 5b

> SEQUÊNCIA 501 K58N

PRGRMTAYAFFVQTCREEHKKKHPEEQVIFAEFSRKCAERWKTMLDKEKQRFHEMAENDKARYELEM
QSYVPPKGAV

> SEQUÊNCIA 502 K58Q

PRGRMTAYAFFVQTCREEHKKKHPEEQVIFAEFSRKCAERWKTMLDKEKQRFHEMAEQDKARYELEM
QSYVPPKGAV

> SEQUÊNCIA 503 D59N

PRGRMTAYAFFVQTCREEHKKKHPEEQVIFAEFSRKCAERWKTMLDKEKQRFHEMAEKNKARYELEM
QSYVPPKGAV

> SEQUÊNCIA 504 D59Q

PRGRMTAYAFFVQTCREEHKKKHPEEQVIFAEFSRKCAERWKTMLDKEKQRFHEMAEKQKARYELEM
QSYVPPKGAV

> SEQUÊNCIA 505 K60N

PRGRMTAYAFFVQTCREEHKKKHPEEQVIFAEFSRKCAERWKTMLDKEKQRFHEMAEKDNARYELEM
QSYVPPKGAV

> SEQUÊNCIA 506 K60Q

PRGRMTAYAFFVQTCREEHKKKHPEEQVIFAEFSRKCAERWKTMLDKEKQRFHEMAEKDQARYELEM
QSYVPPKGAV

> SEQUÊNCIA 507 R62H

PRGRMTAYAFFVQTCREEHKKKHPEEQVIFAEFSRKCAERWKTMLDKEKQRFHEMAEKDKAHYELEM
QSYVPPKGAV

> SEQUÊNCIA 508 R62Q

PRGRMTAYAFFVQTCREEHKKKHPEEQVIFAEFSRKCAERWKTMLDKEKQRFHEMAEKDKAQYELEM
QSYVPPKGAV

> SEQUÊNCIA 509 Y63H

PRGRMTAYAFFVQTCREEHKKKHPEEQVIFAEFSRKCAERWKTMLDKEKQRFHEMAEKDKARHELEM
QSYVPPKGAV

> SEQUÊNCIA 510 Y63I

PRGRMTAYAFFVQTCREEHKKKHPEEQVIFAEFSRKCAERWKTMLDKEKQRFHEMAEKDKARIELEMQ
SYVPPKGAV

> SEQUÊNCIA 511 E64Q

PRGRMTAYAFFVQTCREEHKKKHPEEQVIFAEFSRKCAERWKTMLDKEKQRFHEMAEKDKARYQLEM
QSYVPPKGAV

> SEQUÊNCIA 512 E64H

PRGRMTAYAFFVQTCREEHKKKHPEEQVIFAEFSRKCAERWKTMLDKEKQRFHEMAEKDKARYHLEM
QSYVPPKGAV

> SEQUÊNCIA 513 E64N

PRGRMTAYAFFVQTCREEHKKKHPEEQVIFAEFSRKCAERWKTMLDKEKQRFHEMAEKDKARYNLEM
QSYVPPKGAV

> SEQUÊNCIA 514 L65I

PRGRMTAYAFFVQTCREEHKKKHPEEQVIFAEFSRKCAERWKTMLDKEKQRFHEMAEKDKARYEIMQ

Continuação da figura 5b

SYVPPKGAV

> SEQUÊNCIA 515 L85V

PRGRMTAYAFFVQTCREEHKKKHPEEQVIFAEFSRKCAERWKTMLDKEKQRFHEMAEKDKARYEVEM
QSYVPPKGAV

> SEQUÊNCIA 516 E66Q

PRGRMTAYAFFVQTCREEHKKKHPEEQVIFAEFSRKCAERWKTMLDKEKQRFHEMAEKDKARYELQM
QSYVPPKGAV

> SEQUÊNCIA 517 E66H

PRGRMTAYAFFVQTCREEHKKKHPEEQVIFAEFSRKCAERWKTMLDKEKQRFHEMAEKDKARYELHM
QSYVPPKGAV

> SEQUÊNCIA 518 E66N

PRGRMTAYAFFVQTCREEHKKKHPEEQVIFAEFSRKCAERWKTMLDKEKQRFHEMAEKDKARYELNM
QSYVPPKGAV

> SEQUÊNCIA 519 M67I

PRGRMTAYAFFVQTCREEHKKKHPEEQVIFAEFSRKCAERWKTMLDKEKQRFHEMAEKDKARYELEIQ
SYVPPKGAV

> SEQUÊNCIA 520 M67V

PRGRMTAYAFFVQTCREEHKKKHPEEQVIFAEFSRKCAERWKTMLDKEKQRFHEMAEKDKARYELEV
QSYVPPKGAV

> SEQUÊNCIA 521 Y70H

PRGRMTAYAFFVQTCREEHKKKHPEEQVIFAEFSRKCAERWKTMLDKEKQRFHEMAEKDKARYELEM
QSHVPPKGAV

> SEQUÊNCIA 522 Y70I

PRGRMTAYAFFVQTCREEHKKKHPEEQVIFAEFSRKCAERWKTMLDKEKQRFHEMAEKDKARYELEM
QSYVPPKGAV

> SEQUÊNCIA 523 P72A

PRGRMTAYAFFVQTCREEHKKKHPEEQVIFAEFSRKCAERWKTMLDKEKQRFHEMAEKDKARYELEM
QSYVAPKGAV

> SEQUÊNCIA 524 P72S

PRGRMTAYAFFVQTCREEHKKKHPEEQVIFAEFSRKCAERWKTMLDKEKQRFHEMAEKDKARYELEM
QSYVSPKGAV

> SEQUÊNCIA 525 P73A

PRGRMTAYAFFVQTCREEHKKKHPEEQVIFAEFSRKCAERWKTMLDKEKQRFHEMAEKDKARYELEM
QSYVPAKGAV

> SEQUÊNCIA 526 P73S

PRGRMTAYAFFVQTCREEHKKKHPEEQVIFAEFSRKCAERWKTMLDKEKQRFHEMAEKDKARYELEM
QSYVPSKGAV

> SEQUÊNCIA 527 K74N

PRGRMTAYAFFVQTCREEHKKKHPEEQVIFAEFSRKCAERWKTMLDKEKQRFHEMAEKDKARYELEM
QSYVPPNGAV

> SEQUÊNCIA 528 K74Q

PRGRMTAYAFFVQTCREEHKKKHPEEQVIFAEFSRKCAERWKTMLDKEKQRFHEMAEKDKARYELEM

Continuação da figura 5b

QSYVPPQGAV

Figura 6a

54 aminoácidos de Box A de HMGB1 de *Anopheles gambia* (XP_311154)

Protecção contra proteólise
Se a sequência:

PEEQVIFAEFSRKCAERWKTMLDKEKQRFHEMAEKDKARYELEMQSYVPPKGAV

A negrito aminoácidos sensíveis a proteólise por proteases

Figura 6b

54 aminoácidos de Box A de HMGB1 de *Anopheles gambia* (XP_311154)

Lista de mutantes:

P1A	K24N	E43Q
P1S	K24Q	E43H
E2Q	E25Q	E43N
E2H	E25H	M44I
E2N	E25N	M44V
E3Q	K26N	Y47H
E3H	K26Q	Y47I
E3N	R28H	P49A
F7I	R28Q	P49S
F7V	F29I	P50A
E9Q	F29V	P50S
E9H	E31Q	K51N
E9N	E31H	K51Q
F10I	E31N	
F10V	M32I	
R12H	M32V	
R12Q	E34Q	
K13N	E34H	
K13Q	E34N	
E16Q	K35N	
E16H	K35Q	
E16N	D36N	
R17H	D36Q	
R17Q	K37N	
W18Y	K37Q	
W18S	R39H	
K19N	R39Q	
K19Q	Y40H	
M21I	Y40I	
M21V	E41Q	
L22I	E41H	
L22V	E41N	
D23N	L42I	
D23Q	L42V	

Continuação da figura 6b

- > SEQUÊNCIA 529 Natural
PEEQVIFAEFSRKCAERWKTMLDKEKQRFHEMAEKDKARYELEMQSYVPPKGAV
- > SEQUÊNCIA 530 p1A
AEEQVIFAEFSRKCAERWKTMLDKEKQRFHEMAEKDKARYELEMQSYVPPKGAV
- > SEQUÊNCIA 531 p1S
SEEQVIFAEFSRKCAERWKTMLDKEKQRFHEMAEKDKARYELEMQSYVPPKGAV
- > SEQUÊNCIA 532 E2Q
PQEQVIFAEFSRKCAERWKTMLDKEKQRFHEMAEKDKARYELEMQSYVPPKGAV
- > SEQUENCE 533 E2H
PHEQVIFAEFSRKCAERWKTMLDKEKQRFHEMAEKDKARYELEMQSYVPPKGAV
- > SEQUÊNCIA 534 E2N
PNEQVIFAEFSRKCAERWKTMLDKEKQRFHEMAEKDKARYELEMQSYVPPKGAV
- > SEQUÊNCIA 535 E3Q
PEQQVIFAEFSRKCAERWKTMLDKEKQRFHEMAEKDKARYELEMQSYVPPKGAV
- > SEQUÊNCIA 536 E3H
PEHQVIFAEFSRKCAERWKTMLDKEKQRFHEMAEKDKARYELEMQSYVPPKGAV
- > SEQUÊNCIA 537 E3N
PENQVIFAEFSRKCAERWKTMLDKEKQRFHEMAEKDKARYELEMQSYVPPKGAV
- > SEQUÊNCIA 538 F7I
PEEQVHAEFSRKCAERWKTMLDKEKQRFHEMAEKDKARYELEMQSYVPPKGAV
- > SEQUÊNCIA 539 F7V
PEEQVIVAEFSRKCAERWKTMLDKEKQRFHEMAEKDKARYELEMQSYVPPKGAV
- > SEQUÊNCIA 540 E9Q
PEEQVIFAQFSRKCAERWKTMLDKEKQRFHEMAEKDKARYELEMQSYVPPKGAV
- > SEQUÊNCIA 541 E9H
PEEQVIFAHFSRKCAERWKTMLDKEKQRFHEMAEKDKARYELEMQSYVPPKGAV
- > SEQUÊNCIA 542 E9N
PEEQVIFANFSRKCAERWKTMLDKEKQRFHEMAEKDKARYELEMQSYVPPKGAV
- > SEQUÊNCIA 543 F10I
PEEQVIFAEISRKAERWKTMLDKEKQRFHEMAEKDKARYELEMQSYVPPKGAV
- > SEQUÊNCIA 544 F10V
PEEQVIFAEVSRKAERWKTMLDKEKQRFHEMAEKDKARYELEMQSYVPPKGAV
- > SEQUÊNCIA 545 R12H
PEEQVIFAEFSHKCAERWKTMLDKEKQRFHEMAEKDKARYELEMQSYVPPKGAV
- > SEQUÊNCIA 546 R12Q
PEEQVIFAEFSQKCAERWKTMLDKEKQRFHEMAEKDKARYELEMQSYVPPKGAV

Continuação da figura 6b

- > SEQUÊNCIA 547 K13N
PEEQVIFAEFSRNCAERWKTMLDKEKQRFHEMAEKDKARYELEMQSYVPPKGAV
- > SEQUÊNCIA 548 K13Q
PEEQVIFAEFSRQCAERWKTMLDKEKQRFHEMAEKDKARYELEMQSYVPPKGAV
- > SEQUÊNCIA 549 E16Q
PEEQVIFAEFSRKCAQRWKTMLDKEKQRFHEMAEKDKARYELEMQSYVPPKGAV
- > SEQUÊNCIA 550 E16H
PEEQVIFAEFSRKCAHRWKTMLDKEKQRFHEMAEKDKARYELEMQSYVPPKGAV
- > SEQUÊNCIA 551 E16N
PEEQVIFAEFSRKCANRWKTMLDKEKQRFHEMAEKDKARYELEMQSYVPPKGAV
- > SEQUÊNCIA 552 R17H
PEEQVIFAEFSRKCAHWKTMLDKEKQRFHEMAEKDKARYELEMQSYVPPKGAV
- > SEQUÊNCIA 553 R17Q
PEEQVIFAEFSRKCAEQWKTMLDKEKQRFHEMAEKDKARYELEMQSYVPPKGAV
- > SEQUÊNCIA 554 W18Y
PEEQVIFAEFSRKCAERYKTMLDKEKQRFHEMAEKDKARYELEMQSYVPPKGAV
- > SEQUÊNCIA 555 W18S
PEEQVIFAEFSRKCAERSKTMLDKEKQRFHEMAEKDKARYELEMQSYVPPKGAV
- > SEQUÊNCIA 556 K19N
PEEQVIFAEFSRKCAERWNTMLDKEKQRFHEMAEKDKARYELEMQSYVPPKGAV
- > SEQUÊNCIA 557 K19Q
PEEQVIFAEFSRKCAERWQTMLDKEKQRFHEMAEKDKARYELEMQSYVPPKGAV
- > SEQUÊNCIA 558 M21I
PEEQVIFAEFSRKCAERWKTILDKEKQRFHEMAEKDKARYELEMQSYVPPKGAV
- > SEQUÊNCIA 559 M21V
PEEQVIFAEFSRKCAERWKTVLDKEKQRFHEMAEKDKARYELEMQSYVPPKGAV
- > SEQUÊNCIA 560 L22I
PEEQVIFAEFSRKCAERWKTMLDKEKQRFHEMAEKDKARYELEMQSYVPPKGAV
- > SEQUÊNCIA 561 L22V
PEEQVIFAEFSRKCAERWKTMLDKEKQRFHEMAEKDKARYELEMQSYVPPKGAV
- > SEQUÊNCIA 562 D23N
PEEQVIFAEFSRKCAERWKTMLNKEKQRFHEMAEKDKARYELEMQSYVPPKGAV
- > SEQUÊNCIA 563 D23Q
PEEQVIFAEFSRKCAERWKTMLQKEKQRFHEMAEKDKARYELEMQSYVPPKGAV
- > SEQUÊNCIA 564 K24N
PEEQVIFAEFSRKCAERWKTMLDNEKQRFHEMAEKDKARYELEMQSYVPPKGAV
- > SEQUÊNCIA 565 K24Q
PEEQVIFAEFSRKCAERWKTMLDQEKQRFHEMAEKDKARYELEMQSYVPPKGAV
- > SEQUÊNCIA 566 E25Q

Continuação da figura 6b

PEEQVIFAEFSRKCAERWKTMLDKQKQRFHEMAEKDKARYELEMQSYVPPKGAV

> SEQUÊNCIA **567 E25H**

PEEQVIFAEFSRKCAERWKTMLDKHKQRFHEMAEKDKARYELEMQSYVPPKGAV

> SEQUÊNCIA **568 E25N**

PEEQVIFAEFSRKCAERWKTMLDKNKQRFHEMAEKDKARYELEMQSYVPPKGAV

> SEQUÊNCIA **569 K26N**

PEEQVIFAEFSRKCAERWKTMLDKENQRFHEMAEKDKARYELEMQSYVPPKGAV

> SEQUÊNCIA **570 K26Q**

PEEQVIFAEFSRKCAERWKTMLDKEQQRHEMAEKDKARYELEMQSYVPPKGAV

> SEQUÊNCIA **571 R28H**

PEEQVIFAEFSRKCAERWKTMLDKEKQHFHEMAEKDKARYELEMQSYVPPKGAV

> SEQUÊNCIA **572 R28Q**

PEEQVIFAEFSRKCAERWKTMLDKEKQQFHEMAEKDKARYELEMQSYVPPKGAV

> SEQUÊNCIA **573 F29I**

PEEQVIFAEFSRKCAERWKTMLDKEKQRIHEMAEKDKARYELEMQSYVPPKGAV

> SEQUÊNCIA **574 F29V**

PEEQVIFAEFSRKCAERWKTMLDKEKQRVHEMAEKDKARYELEMQSYVPPKGAV

> SEQUÊNCIA **575 E31Q**

PEEQVIFAEFSRKCAERWKTMLDKEKQRFHQMAEKDKARYELEMQSYVPPKGAV

> SEQUÊNCIA **576 E31H**

PEEQVIFAEFSRKCAERWKTMLDKEKQRFHHMAEKDKARYELEMQSYVPPKGAV

> SEQUÊNCIA **577 E31N**

PEEQVIFAEFSRKCAERWKTMLDKEKQRFHNMAEKDKARYELEMQSYVPPKGAV

> SEQUÊNCIA **578 M32I**

PEEQVIFAEFSRKCAERWKTMLDKEKQRFHEJAEKDKARYELEMQSYVPPKGAV

> SEQUÊNCIA **579 M32V**

PEEQVIFAEFSRKCAERWKTMLDKEKQRFHEVAEKDKARYELEMQSYVPPKGAV

> SEQUÊNCIA **580 E34Q**

PEEQVIFAEFSRKCAERWKTMLDKEKQRFHEMAQKDKARYELEMQSYVPPKGAV

> SEQUÊNCIA **581 E34H**

PEEQVIFAEFSRKCAERWKTMLDKEKQRFHEMAHKDKARYELEMQSYVPPKGAV

> SEQUÊNCIA **582 E34N**

PEEQVIFAEFSRKCAERWKTMLDKEKQRFHEMANKDKARYELEMQSYVPPKGAV

> SEQUÊNCIA **583 K35N**

PEEQVIFAEFSRKCAERWKTMLDKEKQRFHEMAENDKARYELEMQSYVPPKGAV

> SEQUÊNCIA **584 K35Q**

PEEQVIFAEFSRKCAERWKTMLDKEKQRFHEMAEQDKARYELEMQSYVPPKGAV

> SEQUÊNCIA **585 D36N**

Continuação da figura 6b

PEEQVIFAEFSRKCAERWKTMLDKEKQRFHEMAEKNKARYELEMQSYVPPKGAV

> SEQUÊNCIA 586 D36Q

PEEQVIFAEFSRKCAERWKTMLDKEKQRFHEMAEKQKARYELEMQSYVPPKGAV

> SEQUÊNCIA 587 K37N

PEEQVIFAEFSRKCAERWKTMLDKEKQRFHEMAEKDNARYELEMQSYVPPKGAV

> SEQUÊNCIA 588 K37Q

PEEQVIFAEFSRKCAERWKTMLDKEKQRFHEMAEKDQARYELEMQSYVPPKGAV

> SEQUÊNCIA 589 R39H

PEEQVIFAEFSRKCAERWKTMLDKEKQRFHEMAEKDKAHYELEMQSYVPPKGAV

> SEQUÊNCIA 590 R39Q

PEEQVIFAEFSRKCAERWKTMLDKEKQRFHEMAEKDKAQYELEMQSYVPPKGAV

> SEQUÊNCIA 591 Y40H

PEEQVIFAEFSRKCAERWKTMLDKEKQRFHEMAEKDKARHELEMQSYVPPKGAV

> SEQUÊNCIA 592 Y40I

PEEQVIFAEFSRKCAERWKTMLDKEKQRFHEMAEKDKARIELEMQSYVPPKGAV

> SEQUÊNCIA 593 E41Q

PEEQVIFAEFSRKCAERWKTMLDKEKQRFHEMAEKDKARYQLEMQSYVPPKGAV

> SEQUÊNCIA 594 E41H

PEEQVIFAEFSRKCAERWKTMLDKEKQRFHEMAEKDKARYHLEMQSYVPPKGAV

> SEQUÊNCIA 595 E41N

PEEQVIFAEFSRKCAERWKTMLDKEKQRFHEMAEKDKARYNLEMQSYVPPKGAV

> SEQUÊNCIA 596 L42I

PEEQVIFAEFSRKCAERWKTMLDKEKQRFHEMAEKDKARYELEMQSYVPPKGAV

> SEQUÊNCIA 597 L42V

PEEQVIFAEFSRKCAERWKTMLDKEKQRFHEMAEKDKARYEVEMQSYVPPKGAV

> SEQUÊNCIA 598 E43Q

PEEQVIFAEFSRKCAERWKTMLDKEKQRFHEMAEKDKARYELOMQSYVPPKGAV

> SEQUÊNCIA 599 E43H

PEEQVIFAEFSRKCAERWKTMLDKEKQRFHEMAEKDKARYELHMQSYVPPKGAV

> SEQUÊNCIA 600 E43N

PEEQVIFAEFSRKCAERWKTMLDKEKQRFHEMAEKDKARYELNMQSYVPPKGAV

> SEQUÊNCIA 601 M44I

PEEQVIFAEFSRKCAERWKTMLDKEKQRFHEMAEKDKARYELEIQSYVPPKGAV

> SEQUÊNCIA 602 M44V

PEEQVIFAEFSRKCAERWKTMLDKEKQRFHEMAEKDKARYELEVVQSYVPPKGAV

> SEQUÊNCIA 603 Y47H

PEEQVIFAEFSRKCAERWKTMLDKEKQRFHEMAEKDKARYELEMQSHVPPKGAV

> SEQUÊNCIA 604 Y47I

PEEQVIFAEFSRKCAERWKTMLDKEKQRFHEMAEKDKARYELEMQSIVPPKGAV

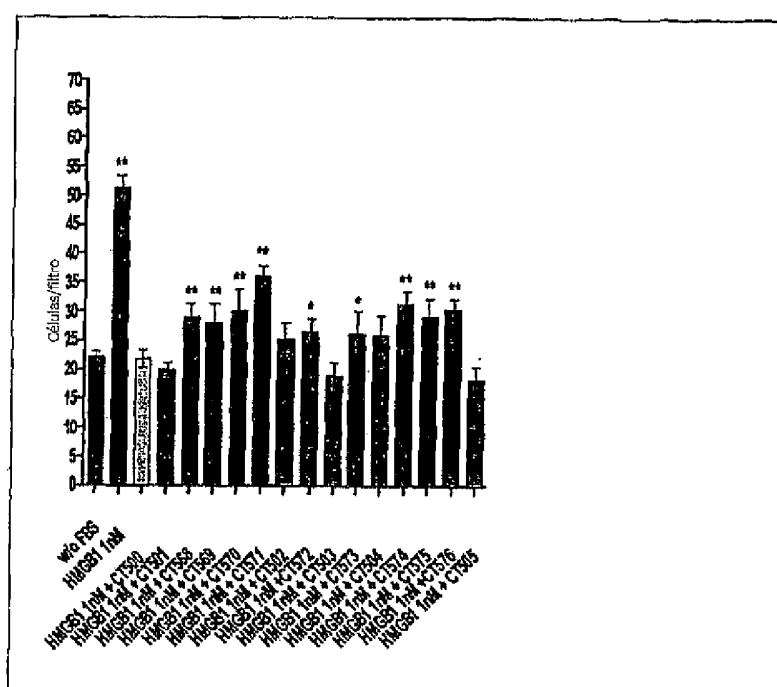
Continuação da figura 6b

- > SEQUÊNCIA **605 P49A**
PEEQVIFAEFSRKCAERWKTMLDKEKQRFHEMAEKDKARYELEMQSYVAPKGAV
- > SEQUÊNCIA **606 P49S**
PEEQVIFAEFSRKCAERWKTMLDKEKQRFHEMAEKDKARYELEMQSYVSPKGAV
- > SEQUÊNCIA **607 P50A**
PEEQVIFAEFSRKCAERWKTMLDKEKQRFHEMAEKDKARYELEMQSYVPAKGAV
- > SEQUÊNCIA **608 P50S**
PEEQVIFAEFSRKCAERWKTMLDKEKQRFHEMAEKDKARYELEMQSYVPSKGAV
- > SEQUÊNCIA **609 K51N**
PEEQVIFAEFSRKCAERWKTMLDKEKQRFHEMAEKDKARYELEMQSYVPPNGAV
- > SEQUÊNCIA **610 K51Q**
PEEQVIFAEFSRKCAERWKTMLDKEKQRFHEMAEKDKARYELEMQSYVPPQGAV

Tabela 7.1

	MÉDIA (Células/filtro)	Desvio Padrão	EPM
w/o FBS	22,04	1,119	0,3956
HMGB1 1 nM	51,13	2,702	0,9552
HMGB1 1 nM + CT500 1nM	21,71	1,803	0,6376
HMGB1 1 nM + CT501 1nM	19,94	1,400	0,4950
HMGB1 1 nM + CT568 1 nM	29,19	2,506	0,8861
HMGB1 1 nM + CT5691 nM	28,06	3,812	1,348
HMGB1 1 nM + CT570 1 nM	30,00	4,569	1,612
HMGB1 1 nM + CT571 1 nM	35,94	2,528	0,8936
HMGB1 1 nM + CT502 1 nM	25,31	3,218	1,138
HMGB1 1 nM + CT572 1 nM	26,63	2,489	0,8801
HMGB1 1 nM + CT503 1 nM	18,75	3,012	1,065
HMGB1 1 nM + CT573 1 nM	26,31	4,383	1,550
HMGB1 1 nM + CT504 1 nM	26,00	4,149	1,467
HMGB1 1 nM + CT574 1 nM	31,19	2,789	0,9862
HMGB1 1 nM + CT575 1 nM	29,13	3,824	1,352
HMGB1 1 nM + CT576 1 nM	30,19	2,404	0,8501
HMGB1 1 nM + CT505 1 nM	18,13	2,900	1,025

Figura 7.1



LEGENDA:	
	maior actividade comparada com CT500
	actividade similar comparada com CT500
	menor actividade comparada com CT500
*	p < 0.05
**	p < 0.01

Tabela 7.2

	MÉDIA (Células/filtro)	Desvio Padrão	EPM
w/o FBS	20,25	1,035	0,3660
HMGB1 1 nM	64,42	8,556	3,025
HMGB1 1 nM + CT500 1nM	23,33	3,505	1,239
HMGB1 1 nM + CT577 1 nM	34,75	2,171	0,7676
HMGB1 1 nM + CT5781 nM	29,56	3,396	1,201
HMGB1 1 nM + CT506 1 nM	25,31	3,936	1,392
HMGB1 1 nM + CT579 1 nM	51,31	4,140	1,464
HMGB1 1 nM + CT580 1 nM	30,44	3,469	1,226
HMGB1 1 nM + CT581 1 nM	30,44	3,469	1,226
HMGB1 1 nM + CT507 1 nM	24,81	4,183	1,479
HMGB1 1 nM + CT582 1 nM	38,22	5,205	1,840
HMGB1 1 nM + CT584 1 nM	30,56	2,796	0,9885
HMGB1 1 nM + CT508 1 nM	25,63	2,838	1,003
HMGB1 1 nM + CT509 1 nM	28,88	1,827	0,6461
HMGB1 1 nM + CT510 1 nM	25,50	5,285	1,868
HMGB1 1 nM + CT585 1 nM	40,63	4,719	1,668

Figura 7.2

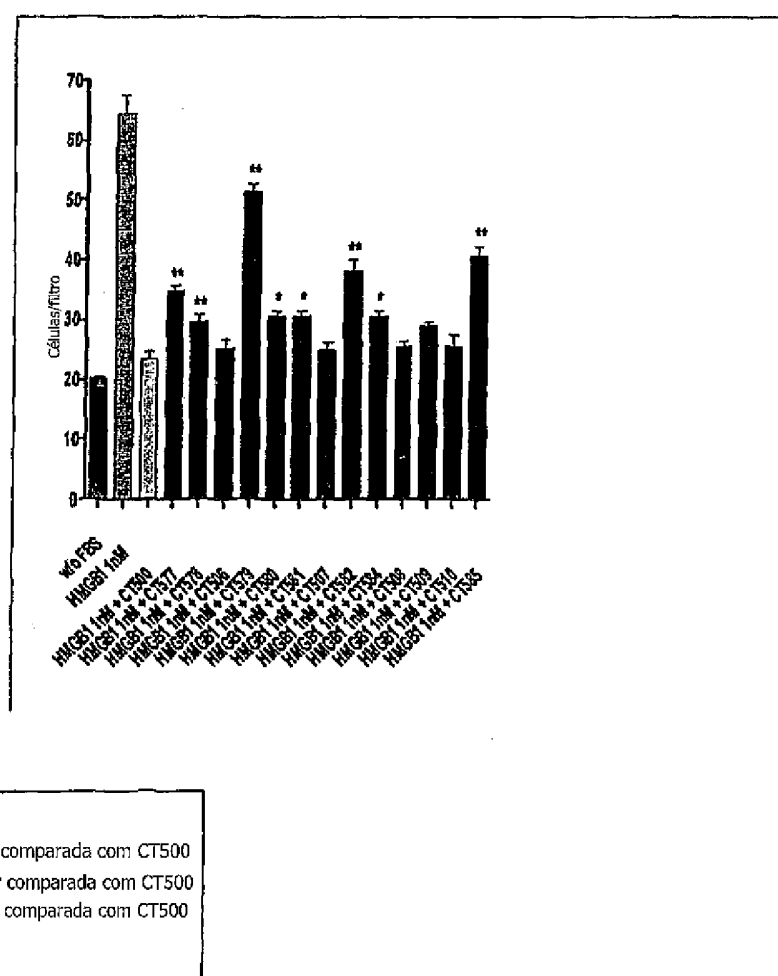


Tabela 7.3

	MÉDIA (Células/filtro)	Desvio Padrão	EPM
w/o FBS	20,38	2,285	0,8078
HMGB1 1 nM	72,54	5,188	1,834
HMGB1 1 nM + CT500 0.5 nM	33,31	2,375	0,8395
HMGB1 1 nM + CT511 0.5 nM	26,31	5,669	2,004
HMGB1 1 nM + CT512 0.5 nM	26,56	2,872	1,015
HMGB1 1 nM + CT513 0.5 nM	25,93	1,512	0,5714
HMGB1 1 nM + CT514 0.5 nM	35,29	2,233	0,8441
HMGB1 1 nM + CT586 0.5 nM	60,06	5,179	1,831
HMGB1 1 nM + CT515 0.5 nM	24,56	3,959	1,400
HMGB1 1 nM + CT516 0.5 nM	29,09	2,949	1,043
HMGB1 1 nM + CT517 0.5 nM	27,25	3,229	1,142
HMGB1 1 nM + CT518 0.5 nM	29,25	2,632	0,9306
HMGB1 1 nM + CT519 0.5 nM	26,81	3,712	1,313
HMGB1 1 nM + CT520 0.5 nM	27,31	3,047	1,077
HMGB1 1 nM + CT521 0.5 nM	29,13	2,888	1,021
HMGB1 1 nM + CT522 0.5 nM	25,69	3,391	1,199

Figura 7.3

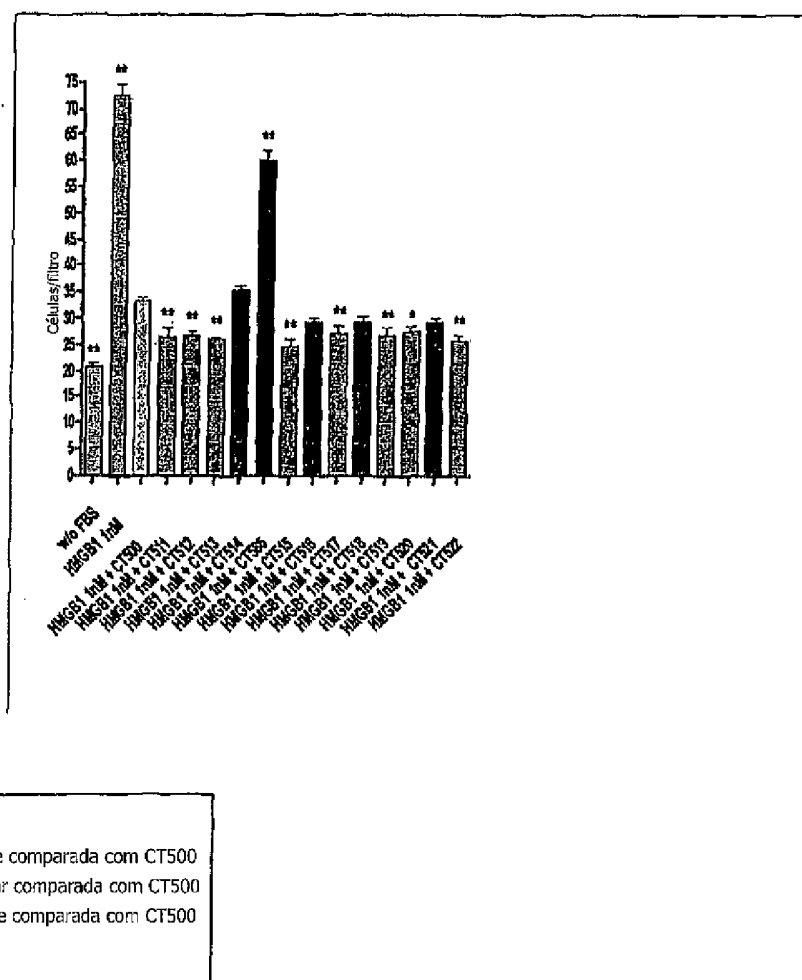


Tabela 7.4

	MÉDIA (Células/filtro)	Desvio Padrão	EPM
w/o FBS	20,27	2,250	0,7955
HMGB1 1 nM	66,58	6,732	2,380
HMGB1 1 nM + CT500 0.5 nM	36,50	3,045	1,076
HMGB1 1 nM + CT523 0.5 nM	34,06	3,849	1,361
HMGB1 1 nM + CT524 0.5 nM	39,57	6,380	2,411
HMGB1 1 nM + CT525 0.5 nM	41,08	4,229	1,495
HMGB1 1 nM + CT526 0.5 nM	34,13	4,764	1,684
HMGB1 1 nM + CT527 0.5 nM	29,88	3,182	1,125
HMGB1 1 nM + CT528 0.5 nM	41,50	2,878	1,018
HMGB1 1 nM + CT588 0.5 nM	60,13	5,848	2,067
HMGB1 1 nM + CT529 0.5 nM	30,13	3,357	1,187
HMGB1 1 nM + CT530 0.5 nM	35,63	2,504	0,8851
HMGB1 1 nM + CT589 0.5 nM	43,88	3,227	1,141
HMGB1 1 nM + CT590 0.5 nM	47,00	2,535	0,8964
HMGB1 1 nM + CT531 0.5 nM	35,25	8,045	2,844
HMGB1 1 nM + CT591 0.5 nM	43,56	3,267	1,155
HMGB1 1 nM + CT532 0.5 nM	26,50	3,094	1,094

Figura 7.4

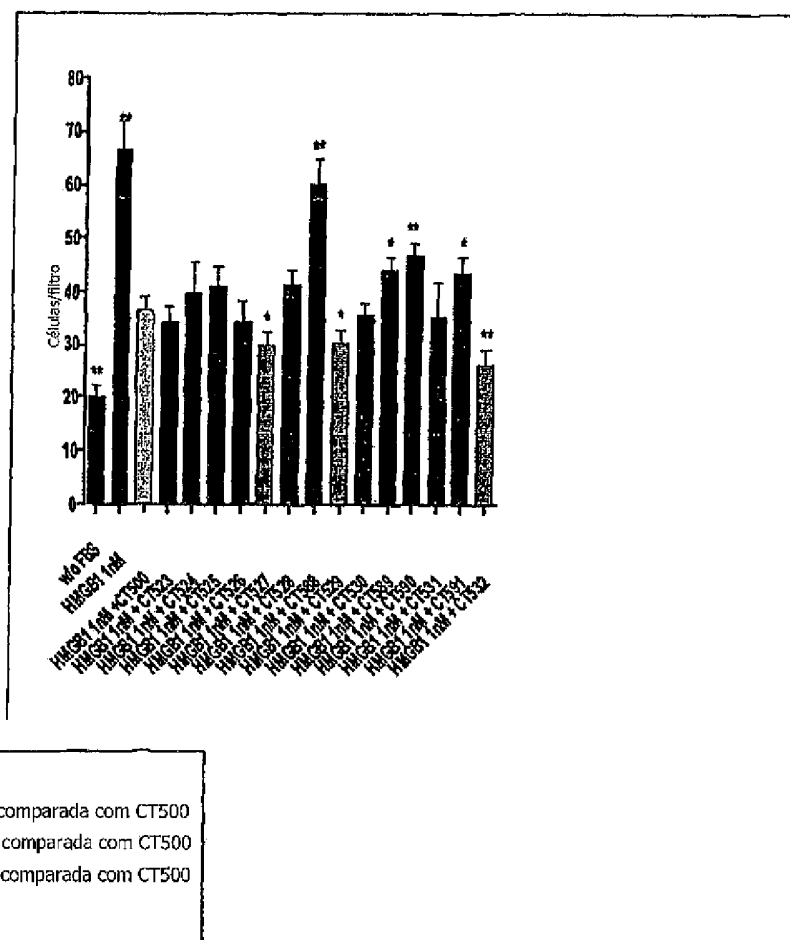


Tabela 7.5

	MÉDIA (Células/filtro)	Desvio Padrão	EPM
w/o FBS	18,48	1,694	0,5988
HMGB1 1 nM	76,81	5,000	1,768
HMGB1 1 nM + CT500 0.5 nM	35,90	0,738	0,2790
HMGB1 1 nM + CT592 0.5 nM	43,00	4,041	1,528
HMGB1 1 nM + CT533 0.5 nM	35,88	4,883	1,726
HMGB1 1 nM + CT593 0.5 nM	47,14	1,574	0,5948
HMGB1 1 nM + CT534 0.5 nM	34,00	3,742	1,323
HMGB1 1 nM + CT535 0.5 nM	33,21	3,534	1,336
HMGB1 1 nM + CT536 0.5 nM	28,00	1,558	0,5510
HMGB1 1 nM + CT537 0.5 nM	28,88	2,925	1,034
HMGB1 1 nM + CT594 0.5 nM	45,31	3,391	1,199
HMGB1 1 nM + CT538 0.5 nM	31,93	3,421	1,293
HMGB1 1 nM + CT539 0.5 nM	34,41	3,265	1,154
HMGB1 1 nM + CT540 0.5 nM	29,81	1,850	0,6542
HMGB1 1 nM + CT541 0.5 nM	27,44	2,195	0,7760
HMGB1 1 nM + CT542 0.5 nM	32,19	5,411	1,913

Figura 7.5

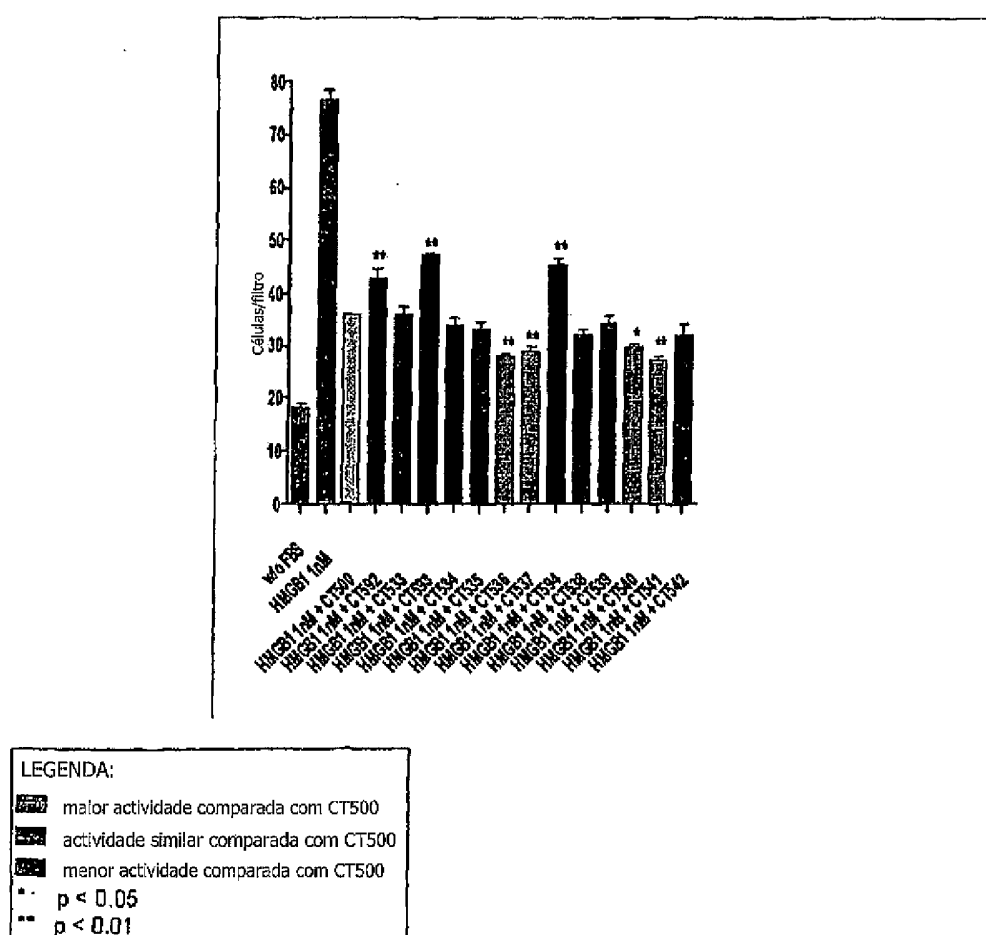


Tabela 7.6

	MÉDIA (Células/filtro)	Desvio Padrão	EPM
w/o FBS	15,25	2,231	0,7887
HMGB1 1 nM	90,04	5,400	1,909
HMGB1 1 nM + CT500 0.5 nM	34,04	1,713	0,6057
HMGB1 1 nM + CT596 0.5 nM	55,56	3,479	1,230
HMGB1 1 nM + CT597 0.5 nM	92,79	11,77	4,449
HMGB1 1 nM + CT598 0.5 nM	64,38	4,446	1,572
HMGB1 1 nM + CT599 0.5 nM	58,81	6,681	2,362
HMGB1 1 nM + CT600 0.5 nM	95,86	7,063	2,670
HMGB1 1 nM + CT601 0.5 nM	67,44	7,302	2,582
HMGB1 1 nM + CT602 0.5 nM	49,63	2,532	0,8952
HMGB1 1 nM + CT603 0.5 nM	41,56	3,923	1,387
HMGB1 1 nM + CT543 0.5 nM	41,44	2,884	1,020
HMGB1 1 nM + CT544 0.5 nM	30,63	1,620	0,5728
HMGB1 1 nM + CT545 0.5 nM	40,13	3,583	1,267
HMGB1 1 nM + CT546 0.5 nM	34,88	4,051	1,432
HMGB1 1 nM + CT547 0.5 nM	41,64	4,661	1,762
HMGB1 1 nM + CT604 0.5 nM	61,88	5,330	1,885

Figura 7.6

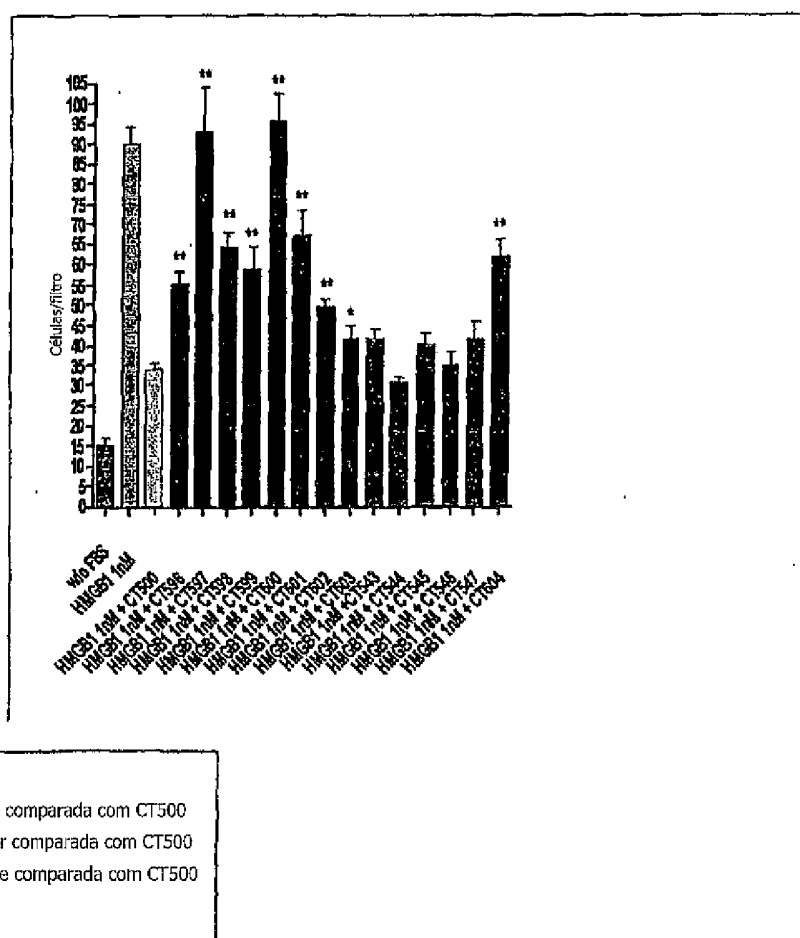


Tabela 7.7

	MÉDIA (Células/filtro)	Desvio Padrão	EPM
w/o FBS	24,33	1,869	0,6607
HMGB1 1 nM	90,58	2,888	1,021
HMGB1 1 nM + CT500 0.5 nM	44,33	4,673	1,652
HMGB1 1 nM + CT548 0.5 nM	45,38	3,068	1,085
HMGB1 1 nM + CT549 0.5 nM	44,56	4,362	1,542
HMGB1 1 nM + CT605 0.5 nM	84,63	5,643	1,995
HMGB1 1 nM + CT606 0.5 nM	83,19	5,182	1,832
HMGB1 1 nM + CT607 0.5 nM	68,00	4,132	1,461
HMGB1 1 nM + CT608 0.5 nM	89,50	6,503	2,299
HMGB1 1 nM + CT609 0.5 nM	89,56	3,110	1,100
HMGB1 1 nM + CT610 0.5 nM	82,19	5,398	1,908
HMGB1 1 nM + CT550 0.5 nM	28,06	3,479	1,230
HMGB1 1 nM + CT551 0.5 nM	37,50	4,862	1,719
HMGB1 1 nM + CT611 0.5 nM	55,88	4,060	1,435
HMGB1 1 nM + CT552 0.5 nM	42,94	3,510	1,241
HMGB1 1 nM + CT553 0.5 nM	40,25	4,097	1,449
HMGB1 1 nM + CT554 0.5 nM	43,69	2,235	0,7902

Figura 7.7

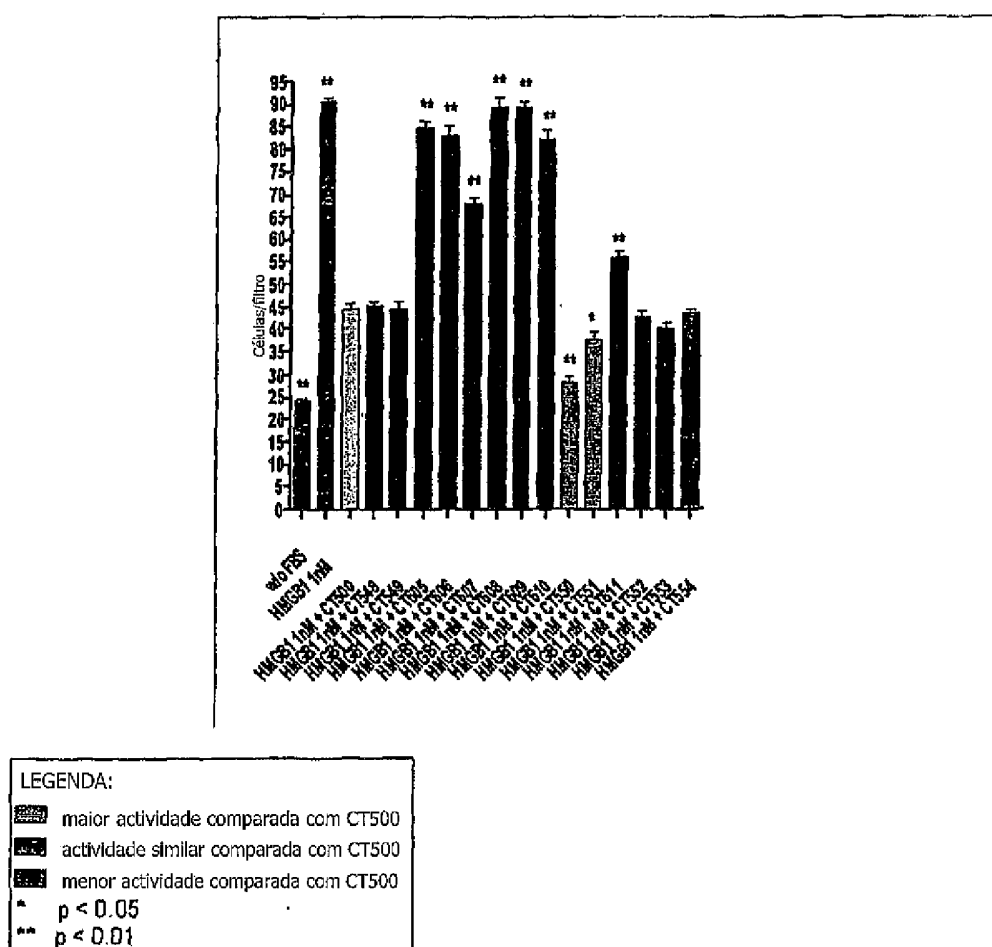
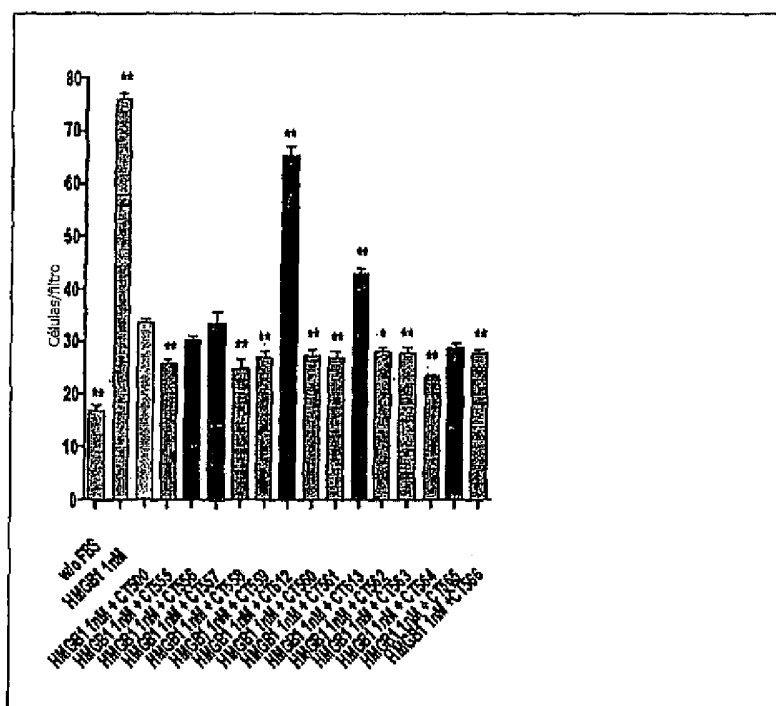


Tabela 7.8

	MÉDIA (Células/filtro)	Desvio Padrão	EPM
w/o FBS	17,10	2,428	0,859
HMGB1 1 nM	75,90	3,613	1,277
HMGB1 1 nM + CT500 0.5 nM	33,33	2,643	0,934
HMGB1 1 nM + CT555 0.5 nM	26,13	2,151	0,760
HMGB1 1 nM + CT556 0.5 nM	30,13	2,774	0,981
HMGB1 1 nM + CT557 0.5 nM	33,63	5,397	1,908
HMGB1 1 nM + CT558 0.5 nM	25,00	3,064	1,573
HMGB1 1 nM + CT559 0.5 nM	26,94	4,448	1,083
HMGB1 1 nM + CT612 0.5 nM	65,13	4,948	1,749
HMGB1 1 nM + CT560 0.5 nM	27,50	2,891	1,022
HMGB1 1 nM + CT561 0.5 nM	27,13	2,973	1,051
HMGB1 1 nM + CT613 0.5 nM	43,06	2,337	0,826
HMGB1 1 nM + CT562 0.5 nM	28,19	1,602	0,567
HMGB1 1 nM + CT563 0.5 nM	27,75	3,381	1,195
HMGB1 1 nM + CT564 0.5 nM	23,38	1,747	0,618
HMGB1 1 nM + CT565 0.5 nM	29,00	2,121	0,750
HMGB1 1 nM + CT566 0.5 nM	27,75	2,220	0,785

Figura 7.8



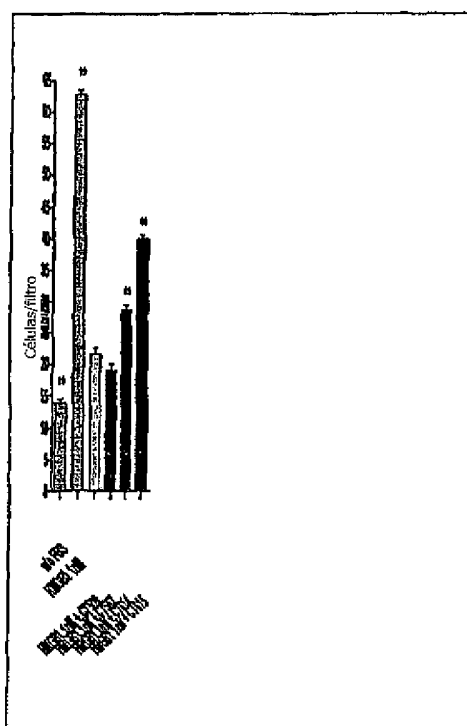
LEGENDA:

- maior actividade comparada com CT500
- actividade similar comparada com CT500
- menor actividade comparada com CT500
- * $p < 0.05$
- ** $p < 0.01$

Tabela 7.9

	MÉDIA (Células/filtro)	Desvio Padrão	EPM
w/o FBS	14,04	1,315	0,4648
HMGB1 1 nM	62,96	1,864	0,659
HMGB1 1 nM + CT500 0.5 nM	21,71	2,155	0,815
HMGB1 1 nM + CT567 0.5 nM	19,31	2,052	0,725
HMGB1 1 nM + CT614 0.5 nM	28,71	2,119	0,801
HMGB1 1 nM + CT615 0.5 nM	39,81	2,154	0,761

Figura 7.9



LEGENDA:

- maior actividade comparada com CT500
- actividade similar comparada com CT500
- menor actividade comparada com CT500

* $p < 0.05$ ** $p < 0.01$

Figura 8

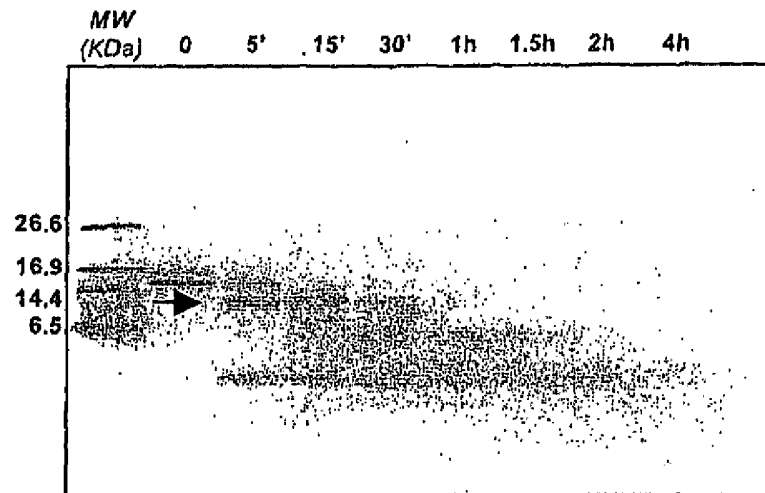


Figura 9.1

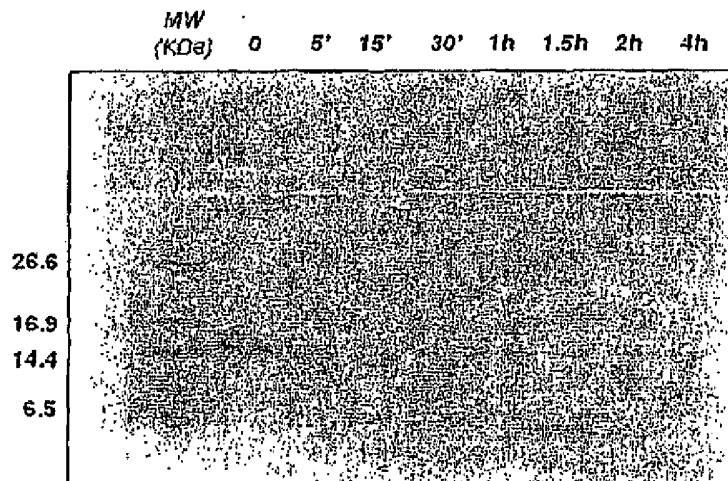


Figura 9.2

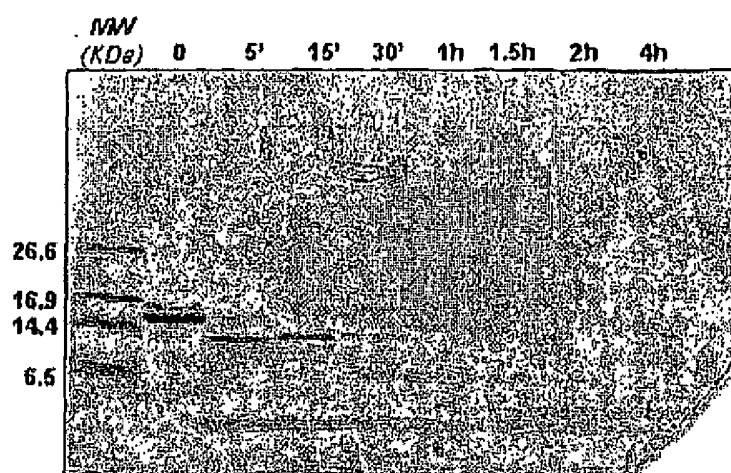


Figura 9.3

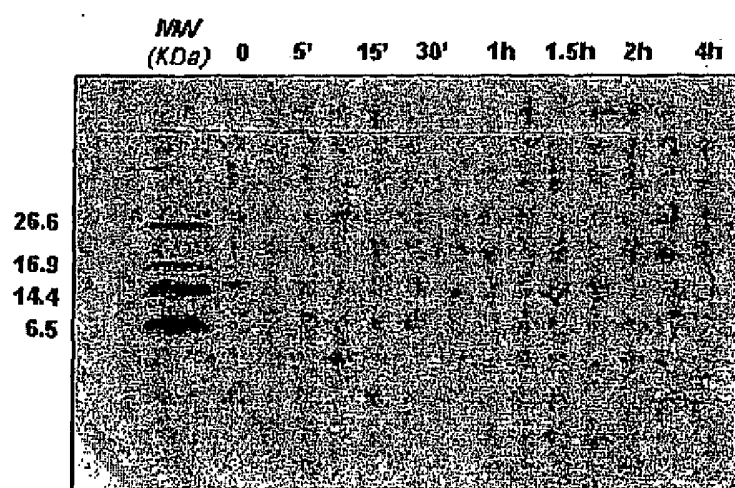


Figura 9.4

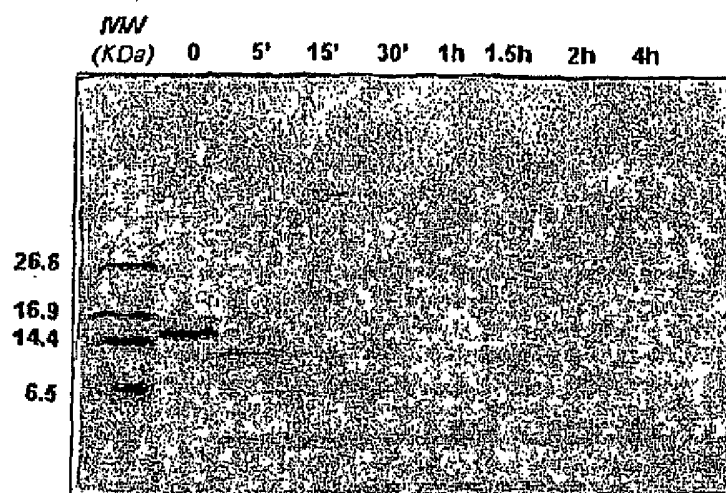


Figura 9.5

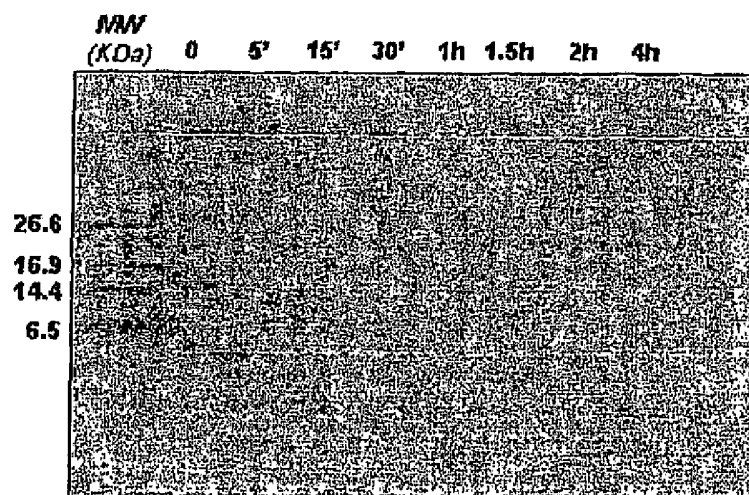


Figura 9.6

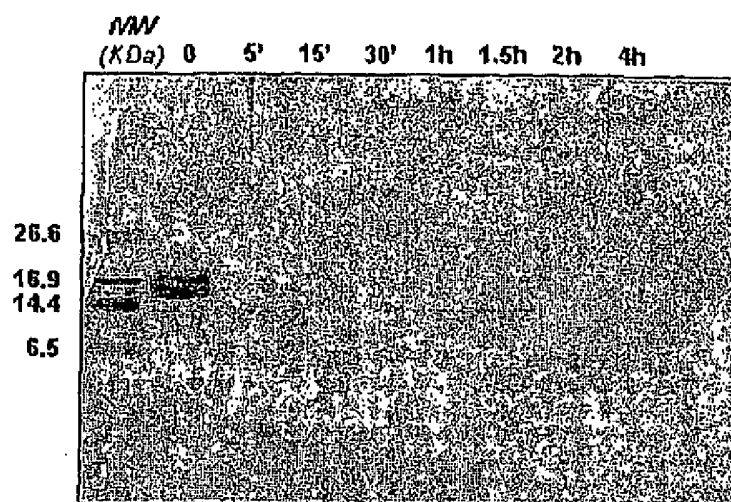


Figura 9.7

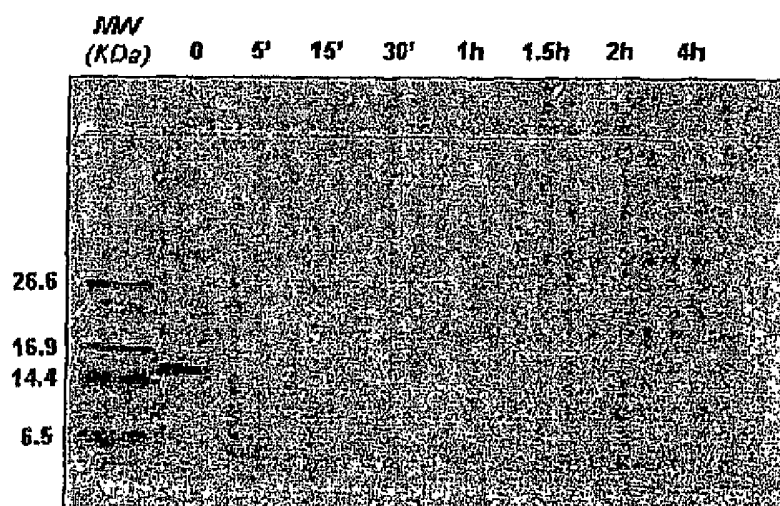


Figura 9.8

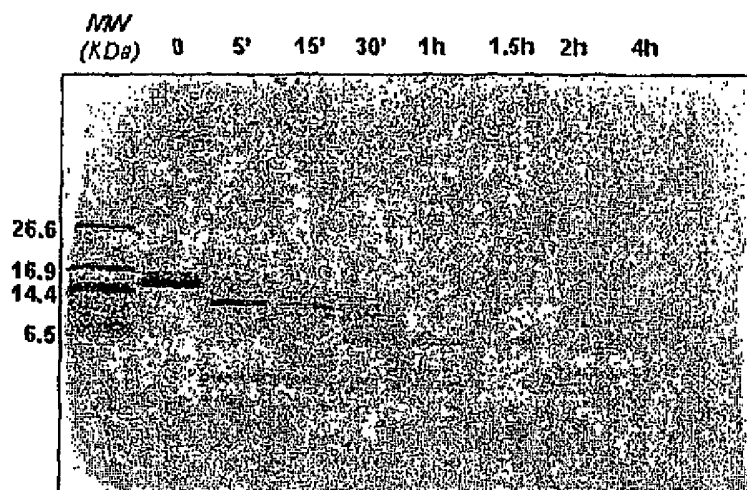


Figura 9.9

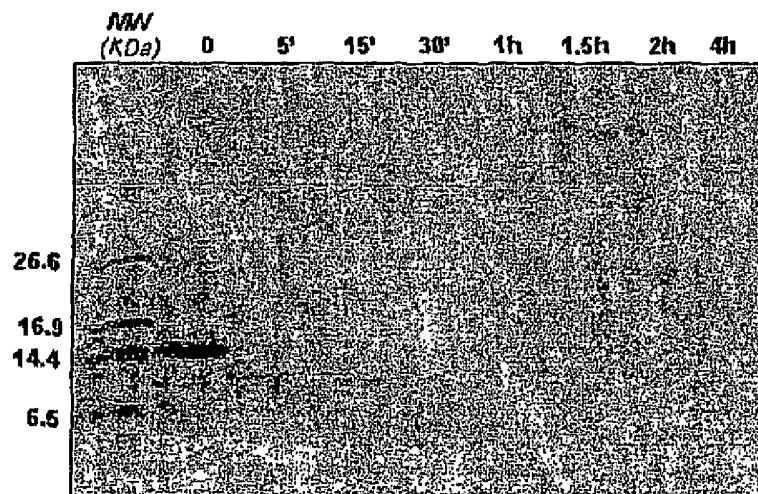


Figura 9.10

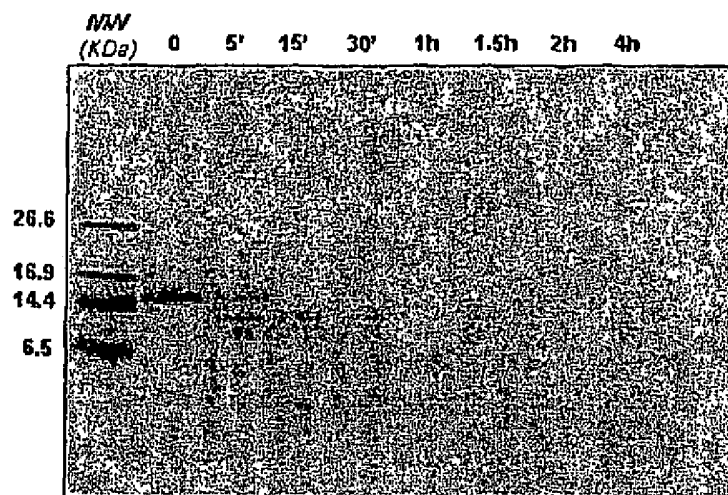


Figura 9.11

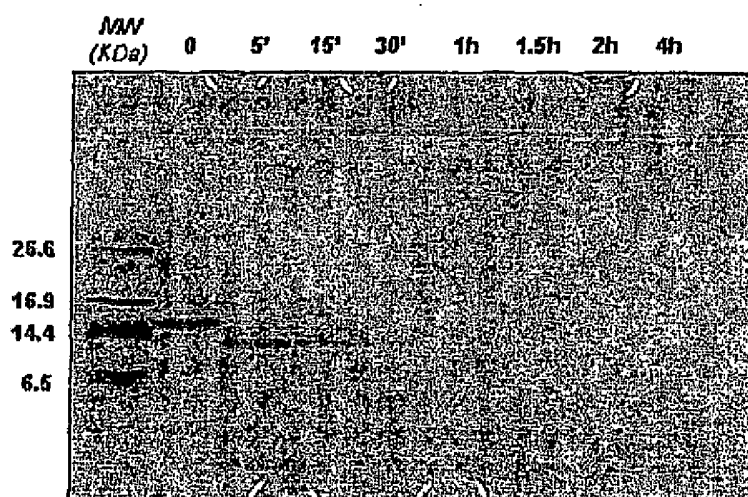


Figura 9.12

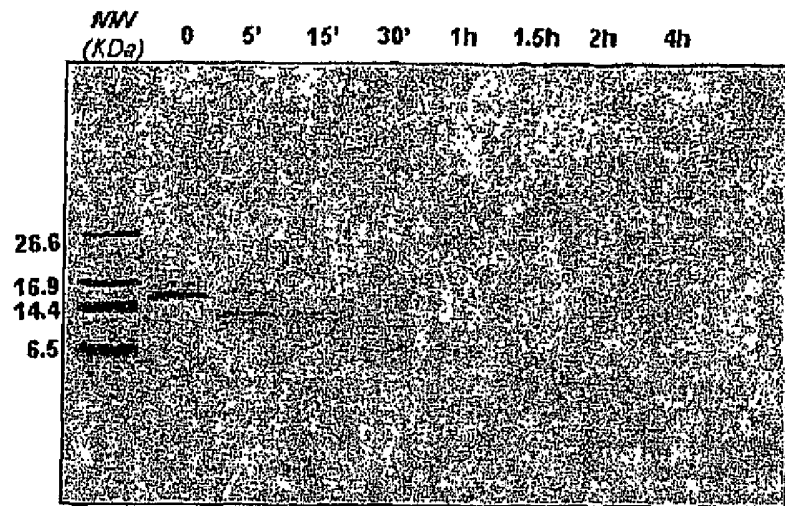


Figura 9.13

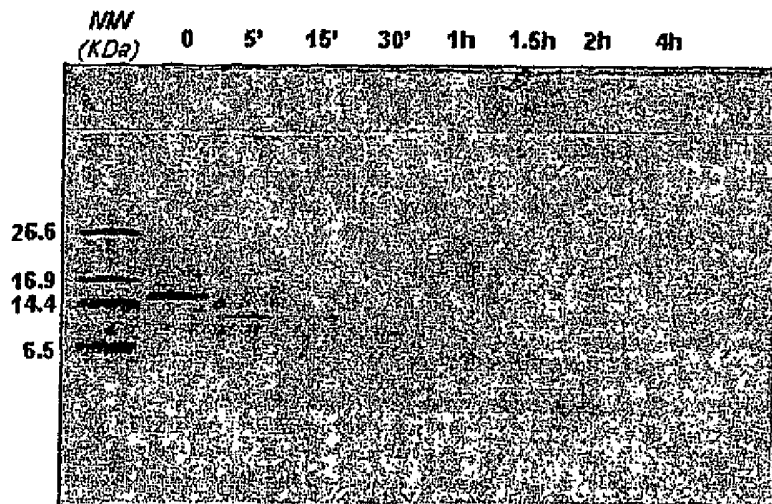


Figura 9.14

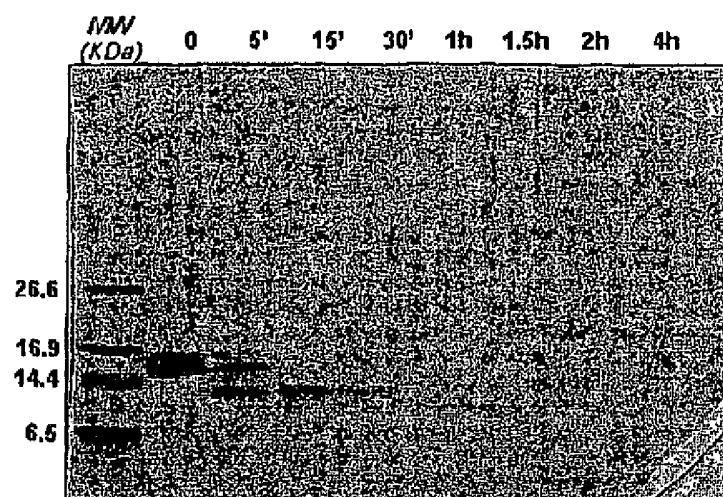


Figura 9.15

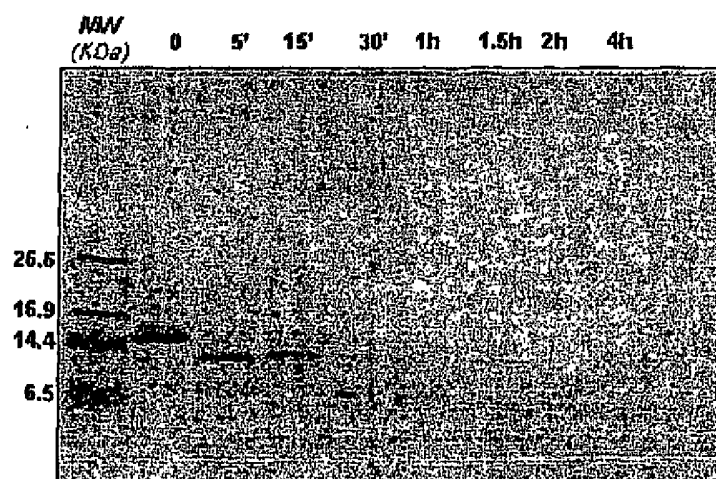


Figura 9.16

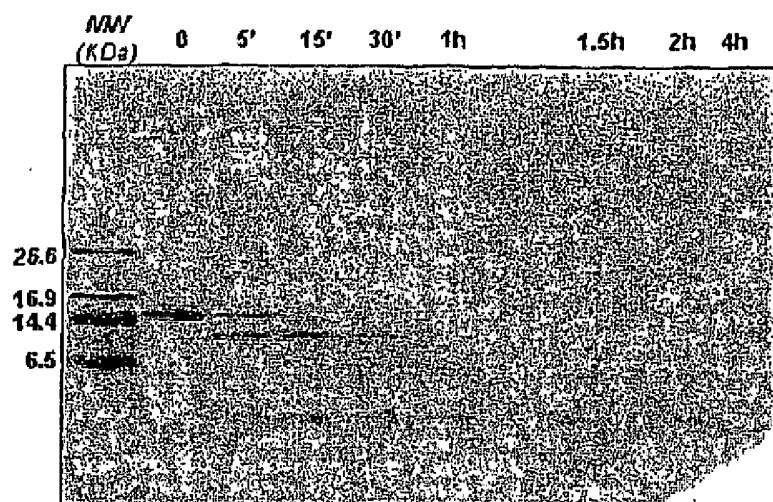


Figura 9.17

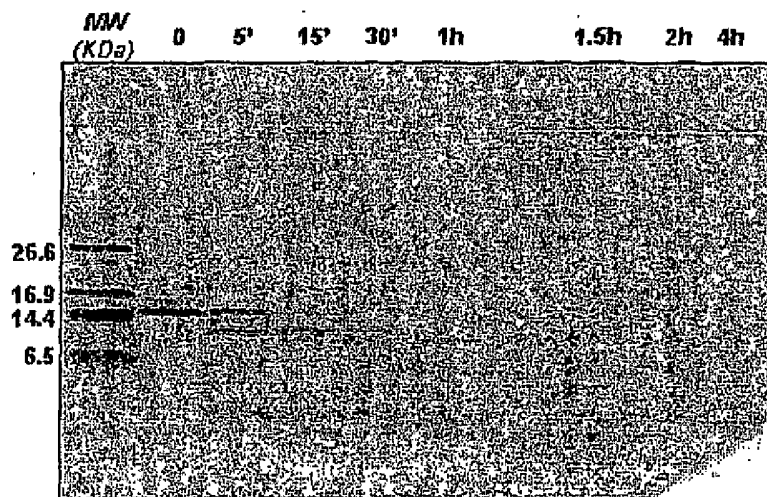


Figura 9.18

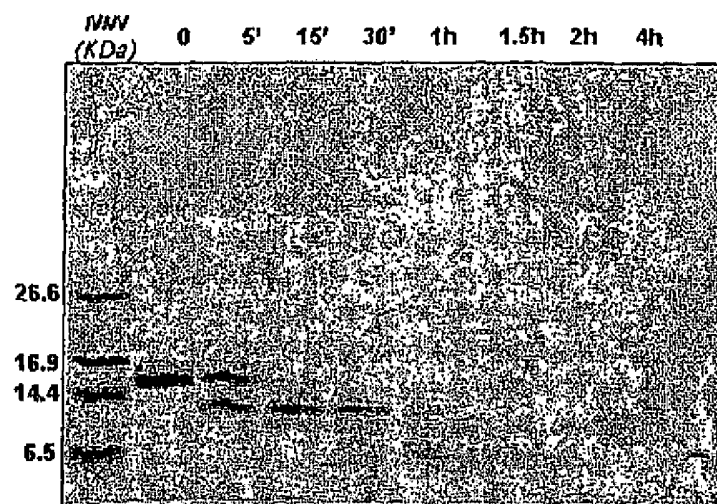


Figura 9.19

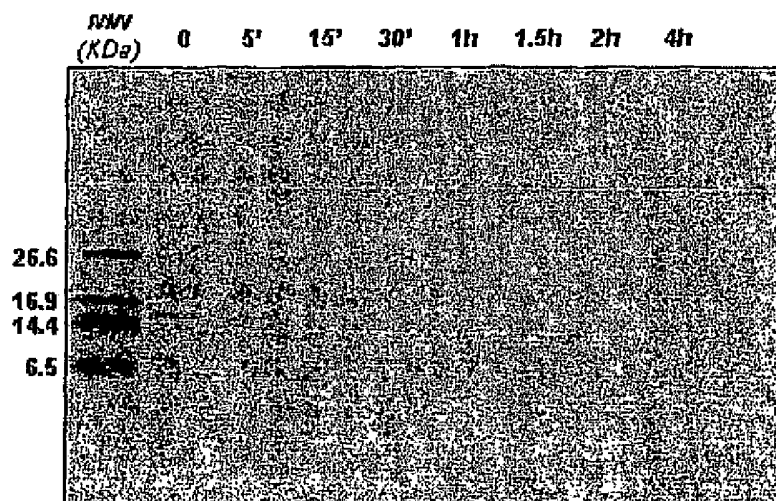


Figura 9.20

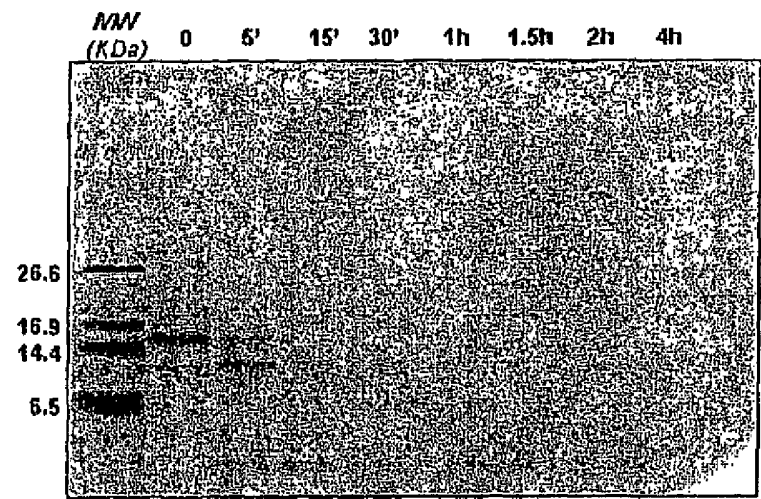


Figura 9.21

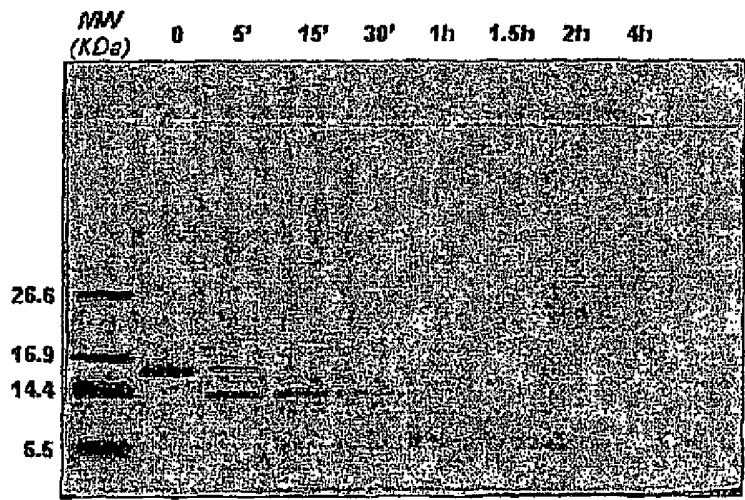


Figura 9.22

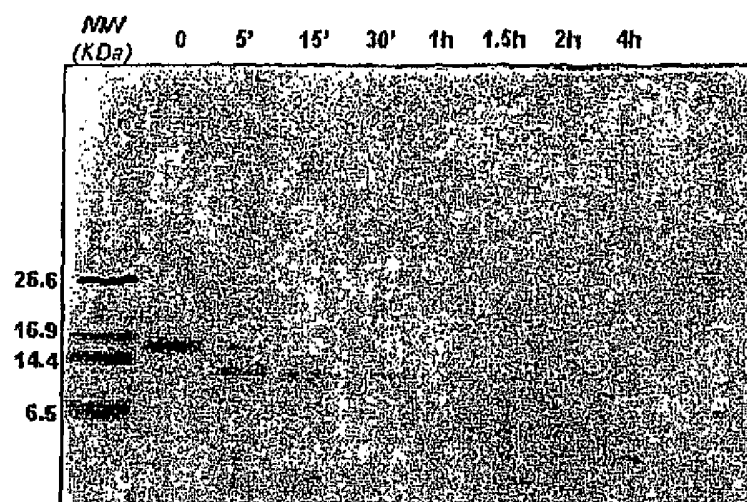


Figura 9.23

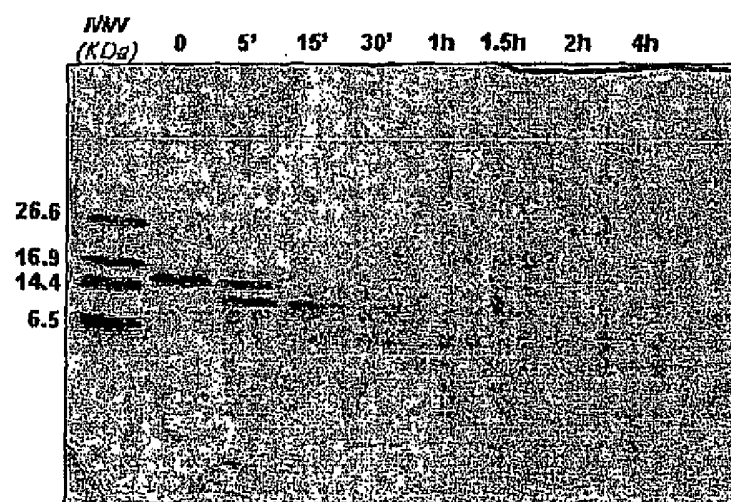


Figura 9.24

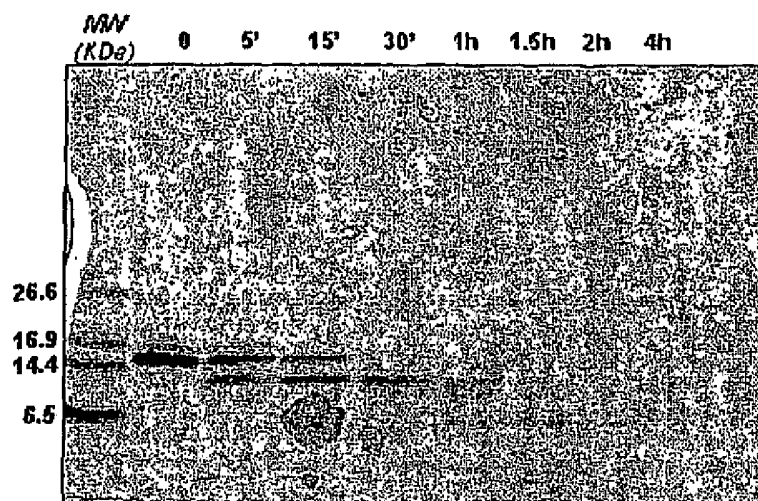


Figura 9.25

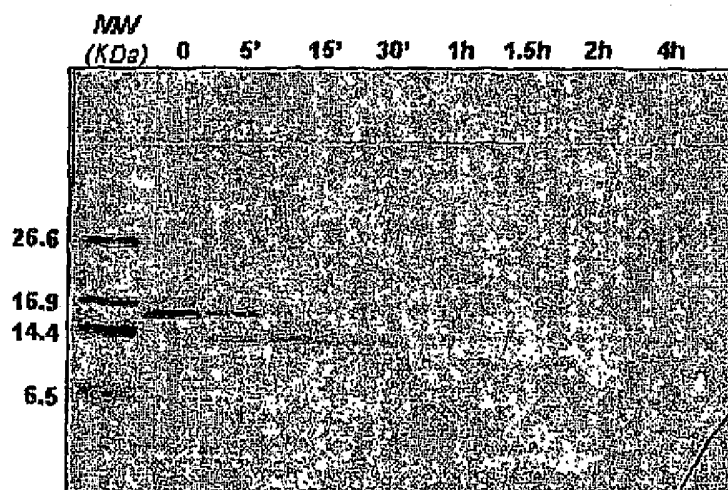


Figura 9.26

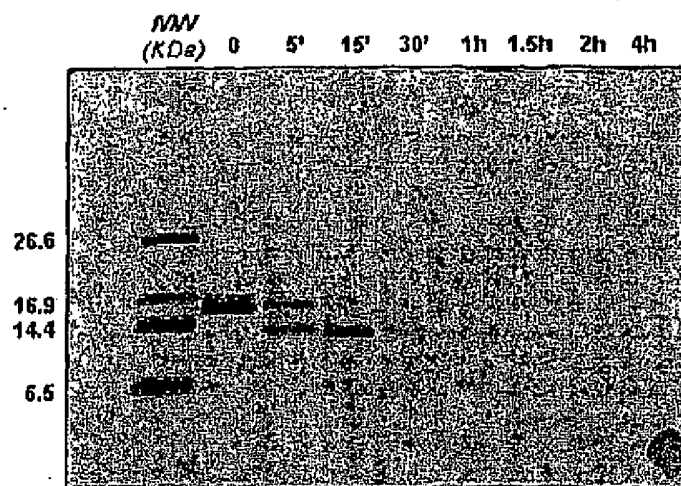


Figura 9.27

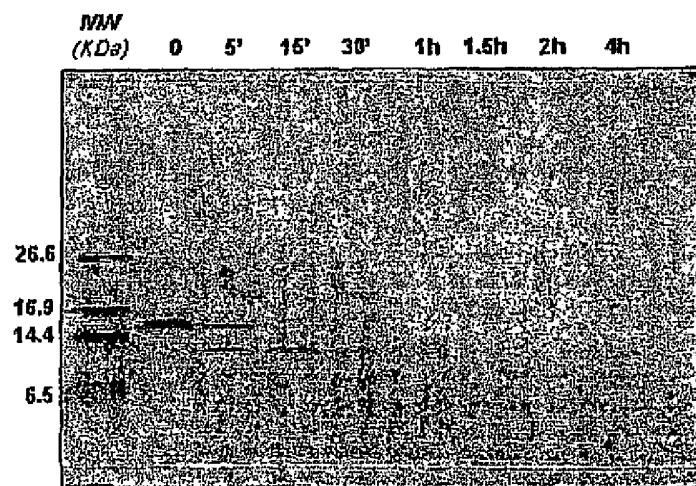


Figura 9.28

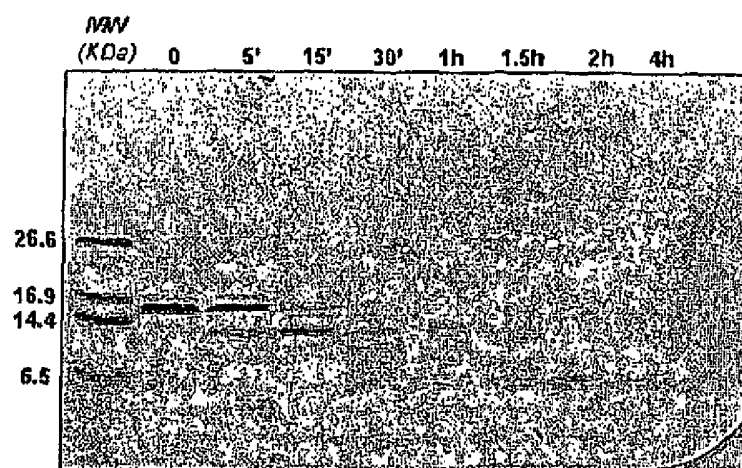


Figura 9.29

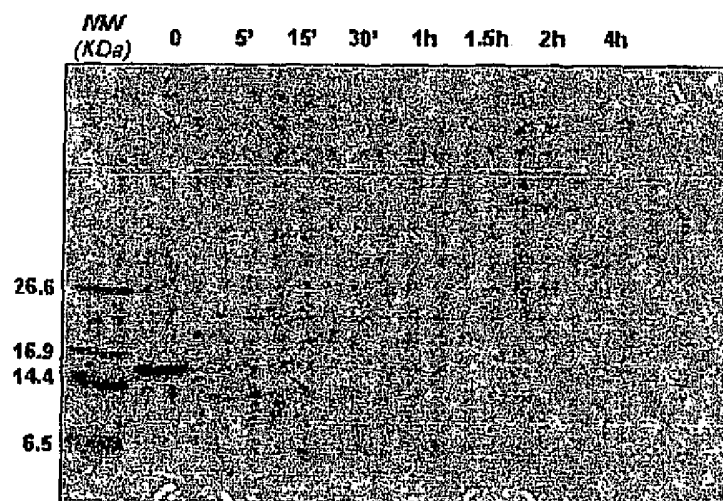


Figura 9.30

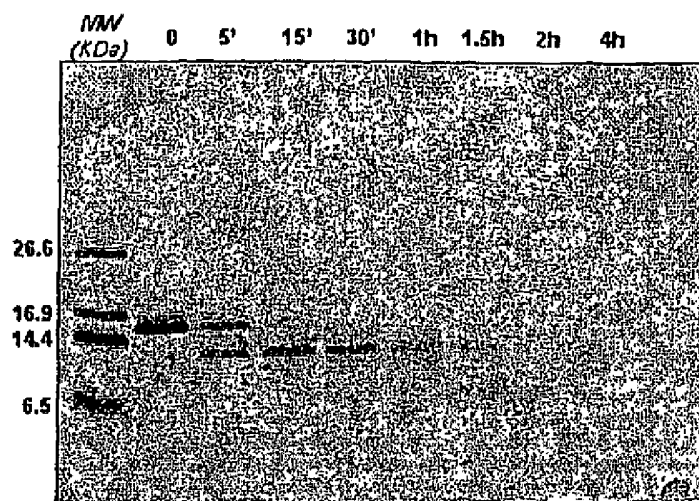


Figura 9.31

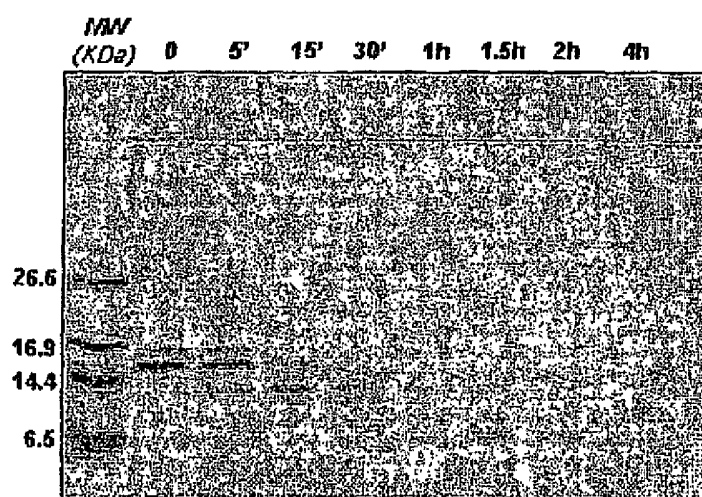


Figura 9.32

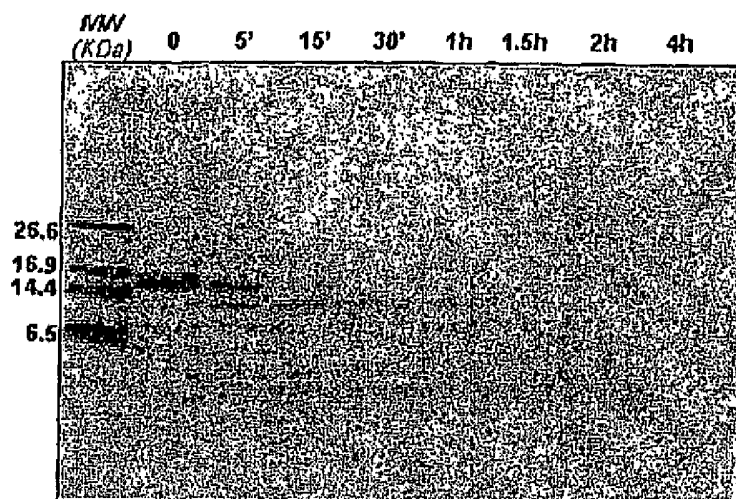


Figura 9.33

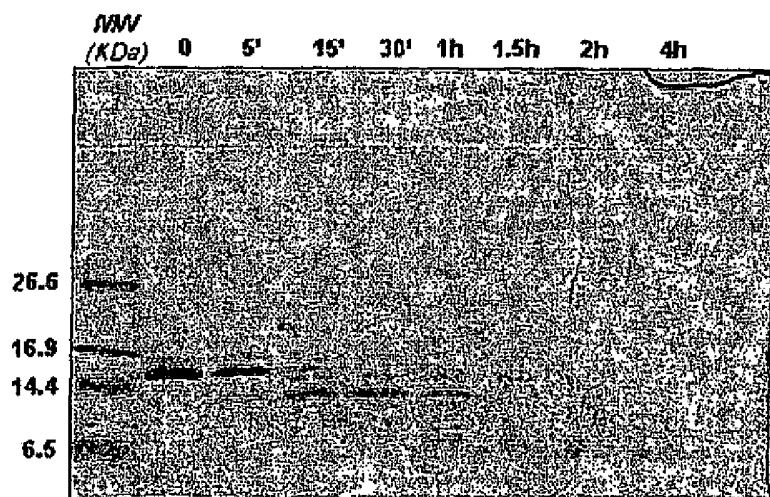


Figura 9.34

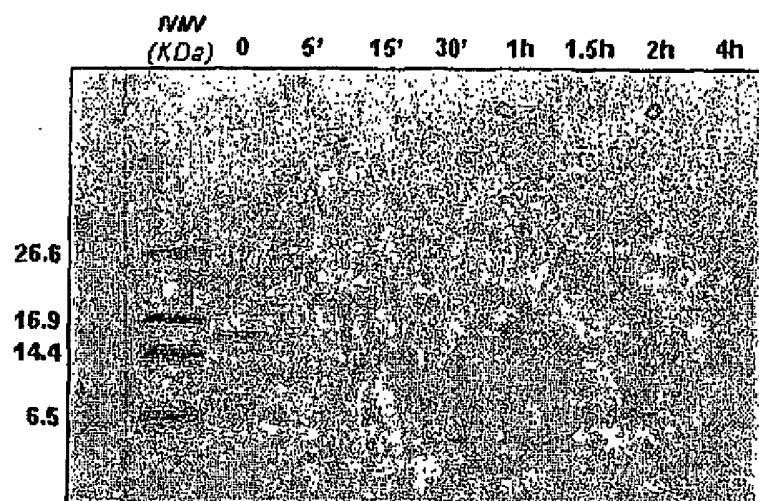


Figura 9.35

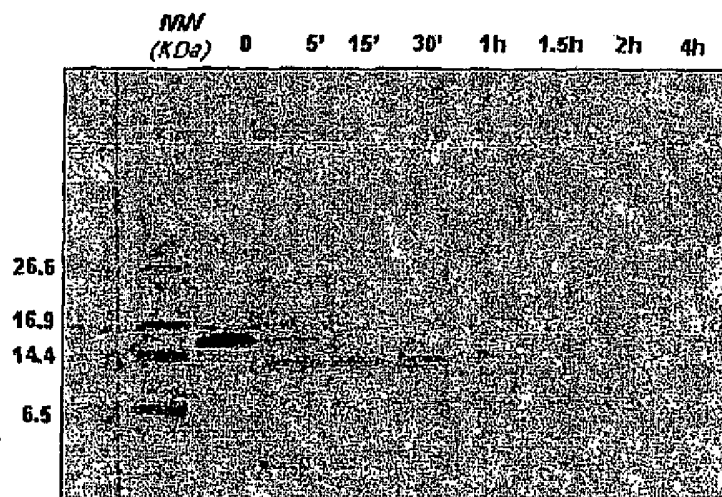


Figura 9.36

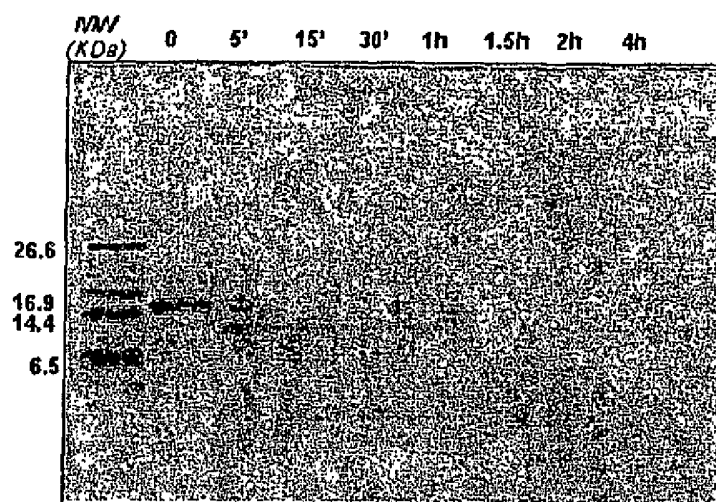


Figura 9.37

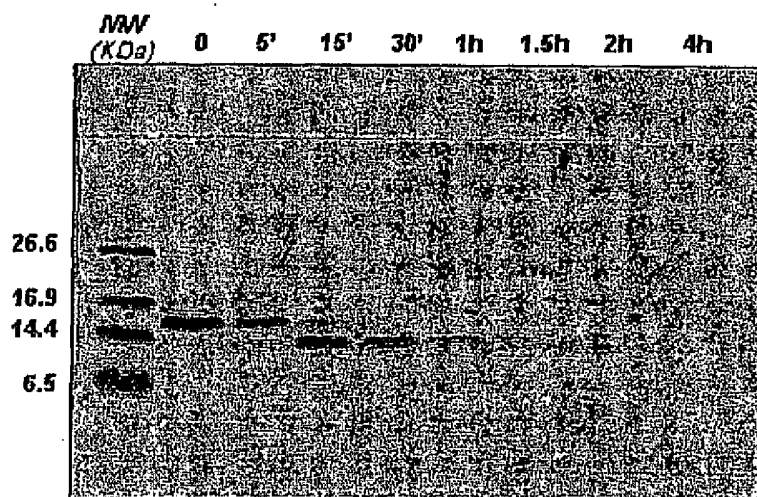


Figura 9.38

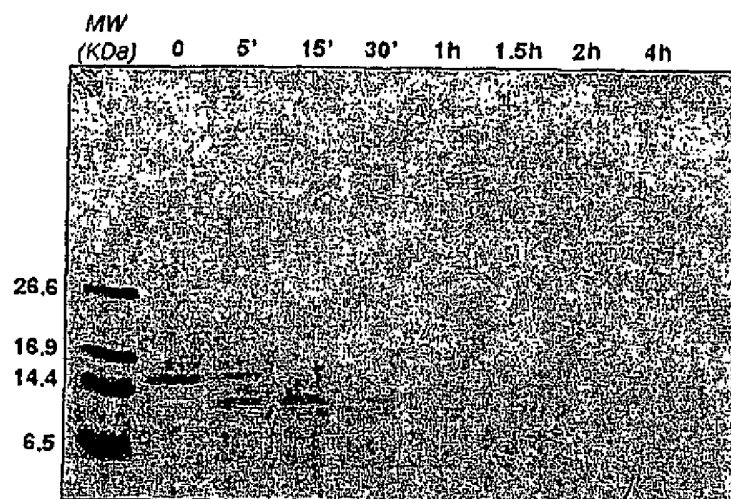


Figura 9.39

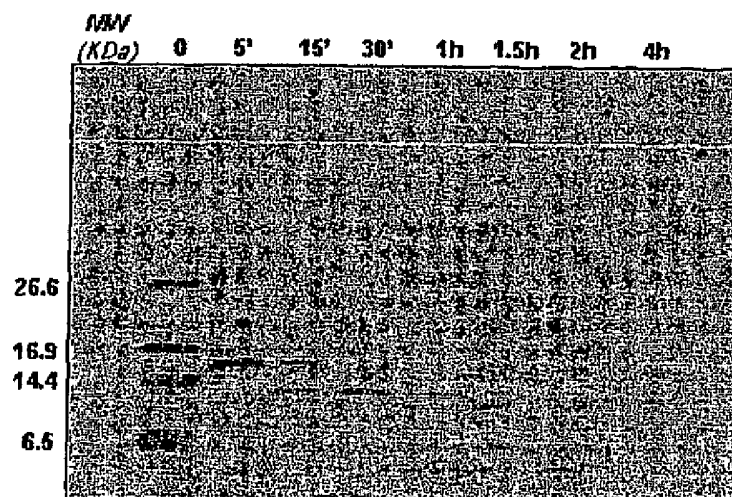


Figura 9.40

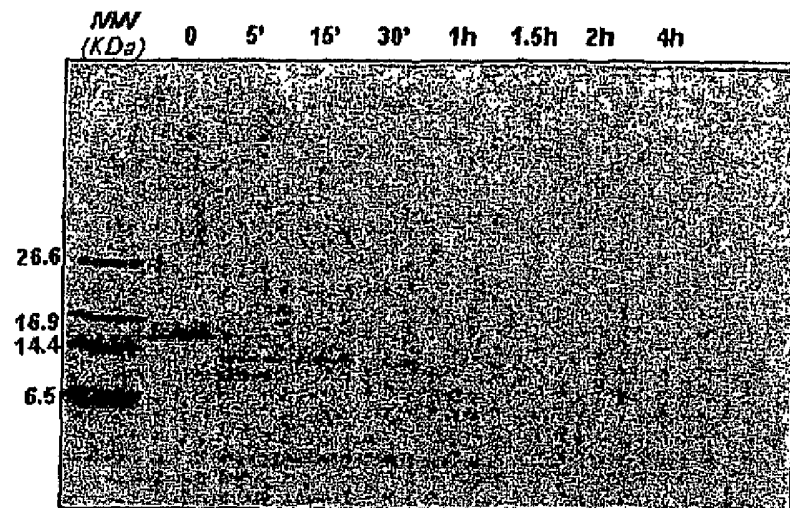


Figura 9.41

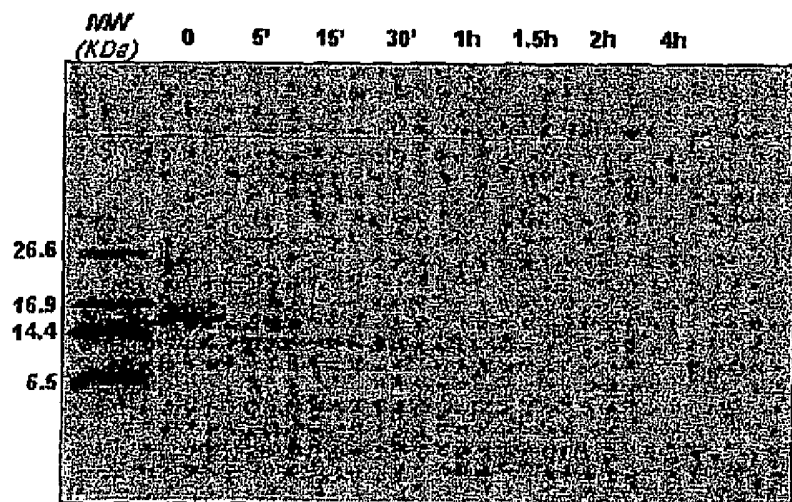


Figura 9.42

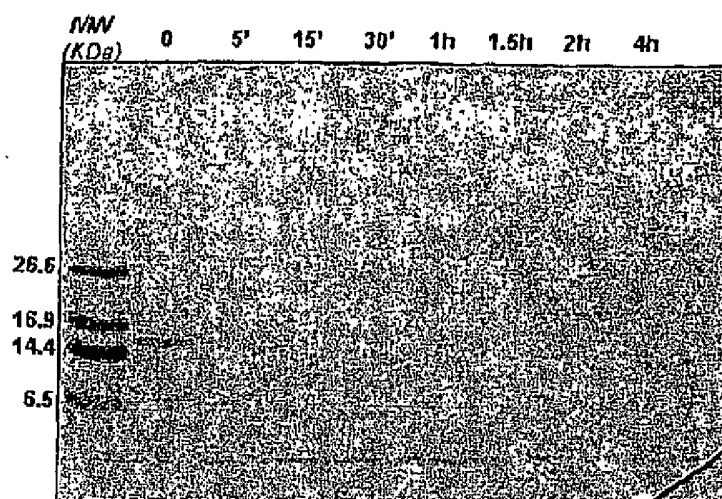


Figura 9.43

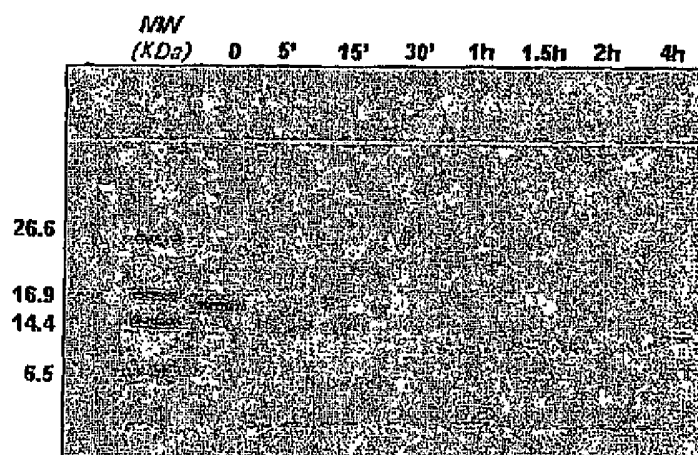


Figura 9.44

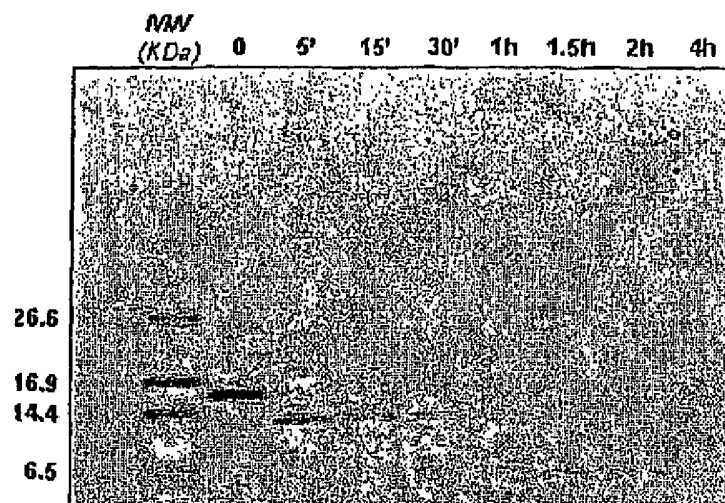


Figura 9.45

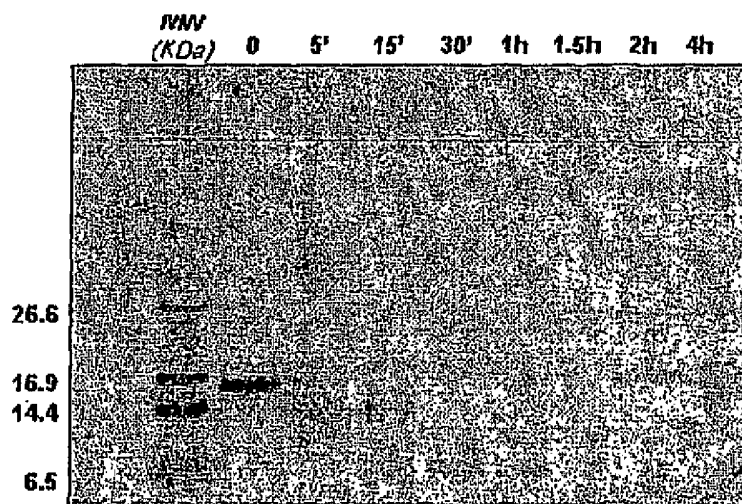


Figura 9.46

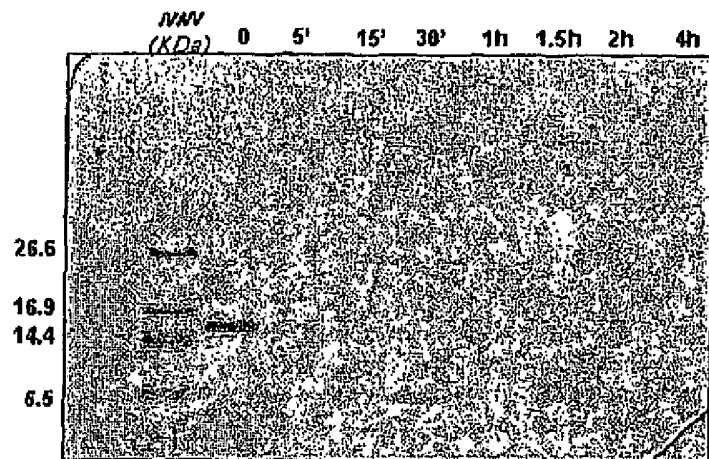


Figura 9.47

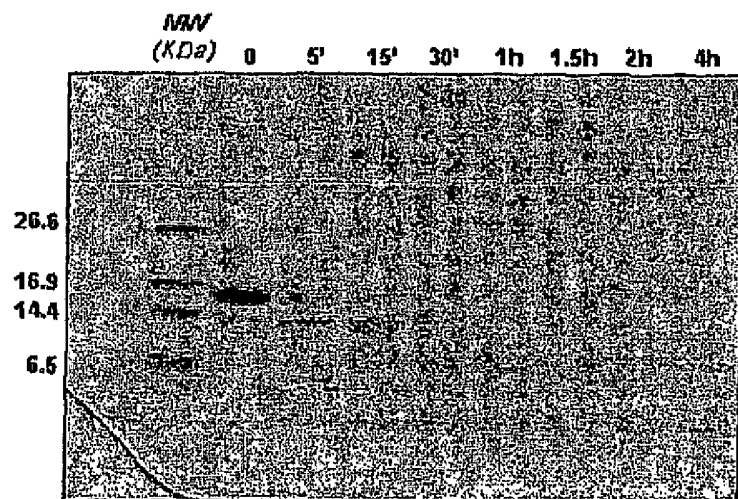


Figura 9.48

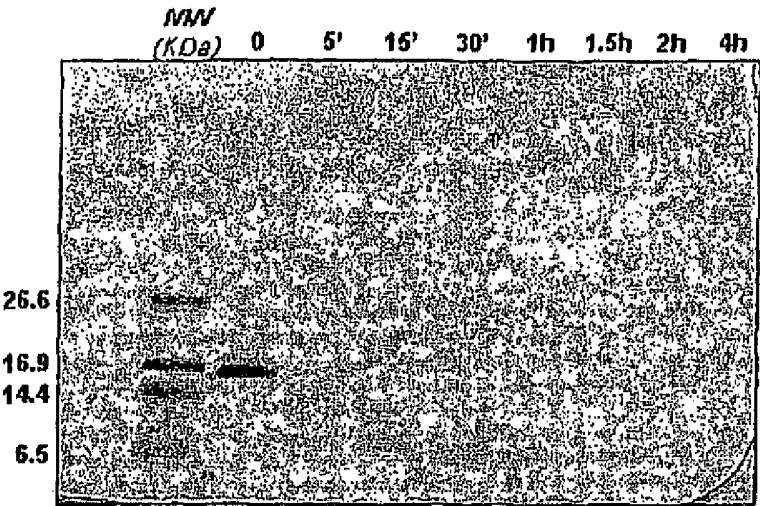


Figura 9.49

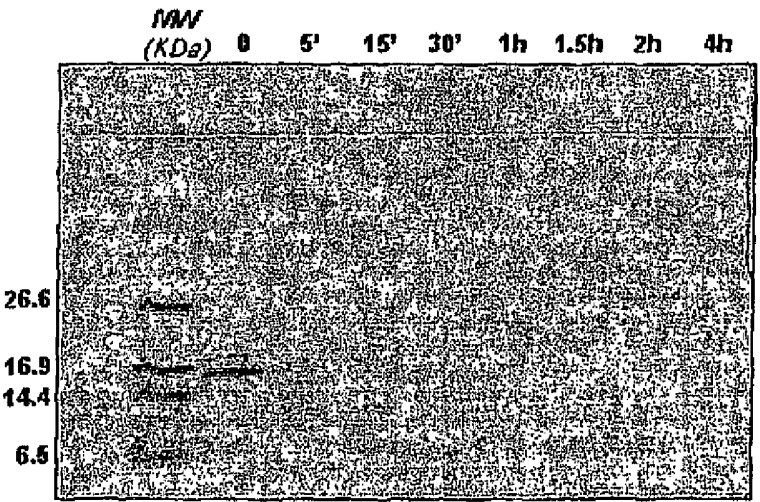


Figura 9.50

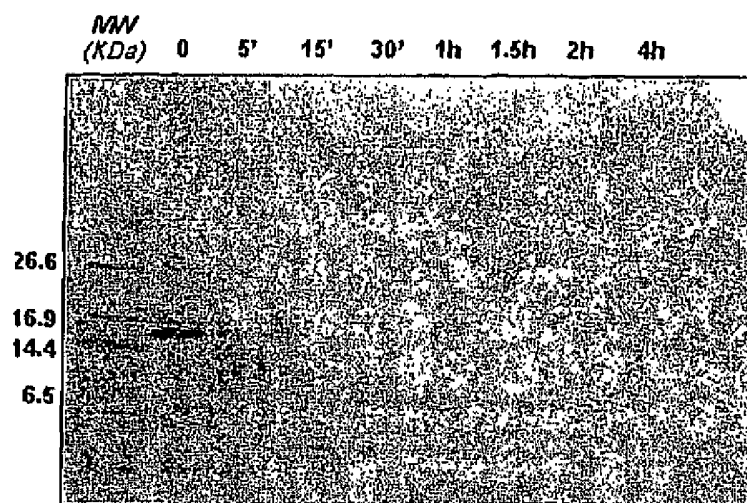


Figura 9.51

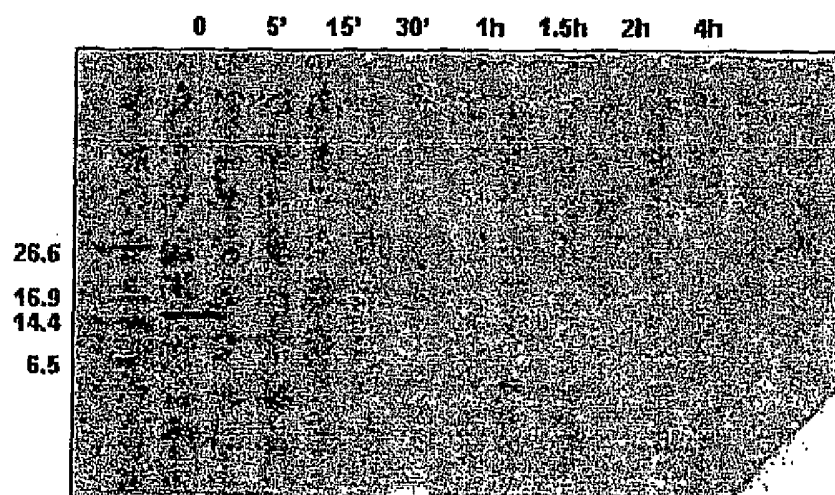


Figura 9.52

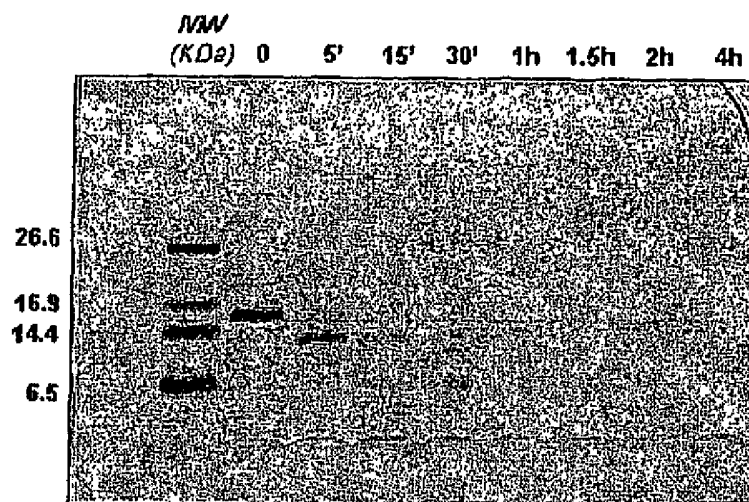


Figura 9.53

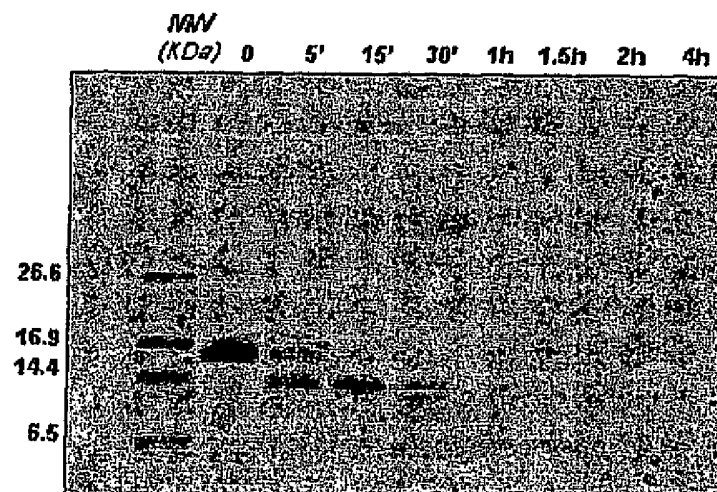


Figura 9.54

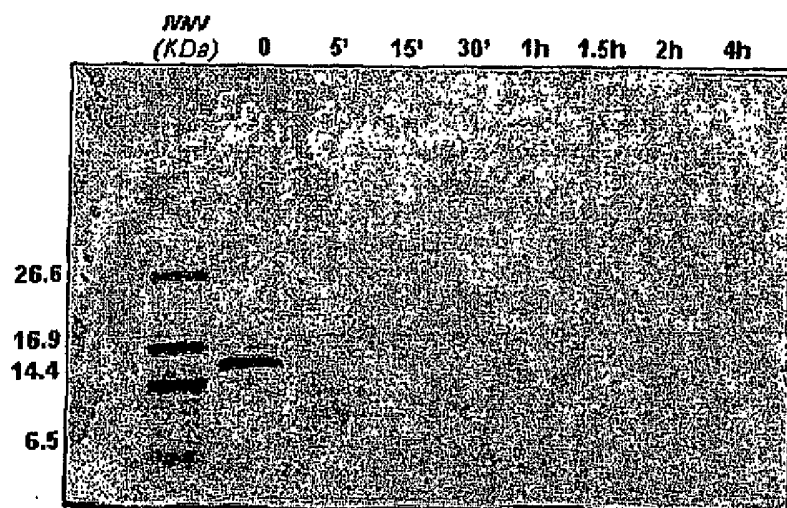


Figura 9.55

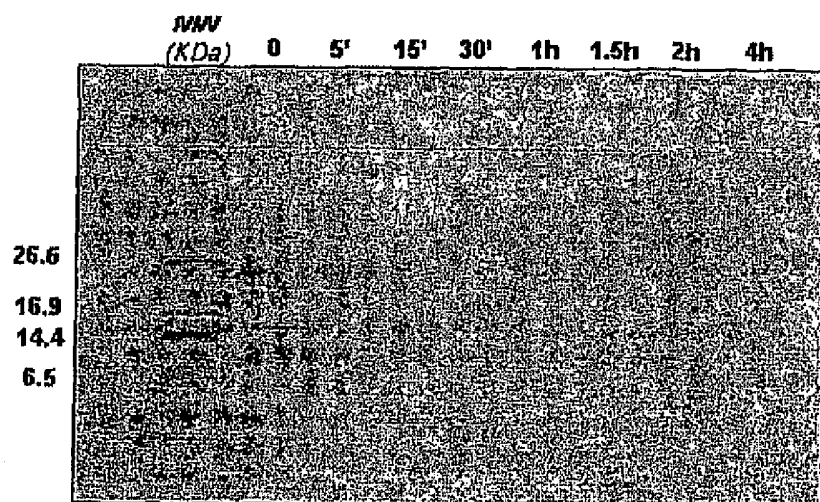


Figura 9.56

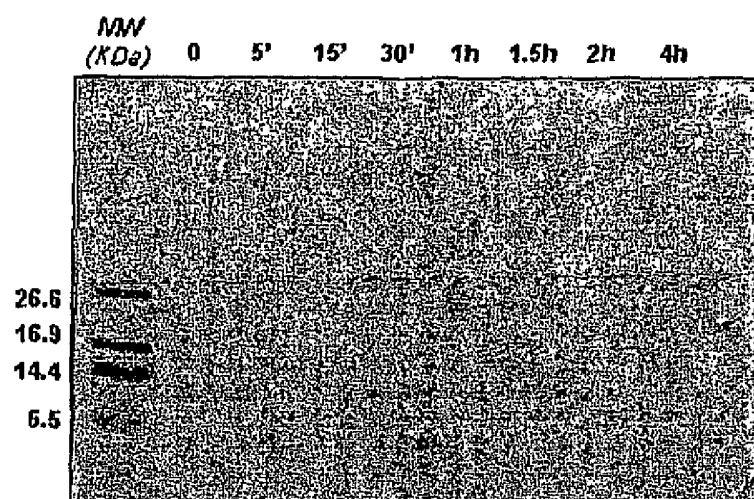


Figura 9.57

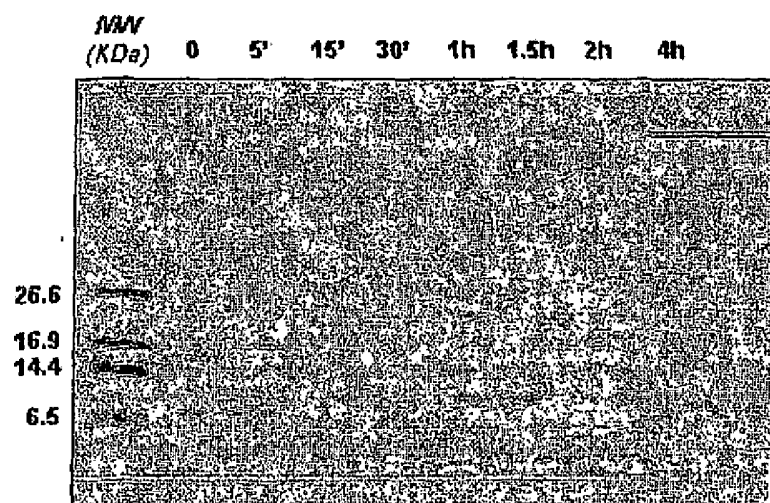


Figura 9.58

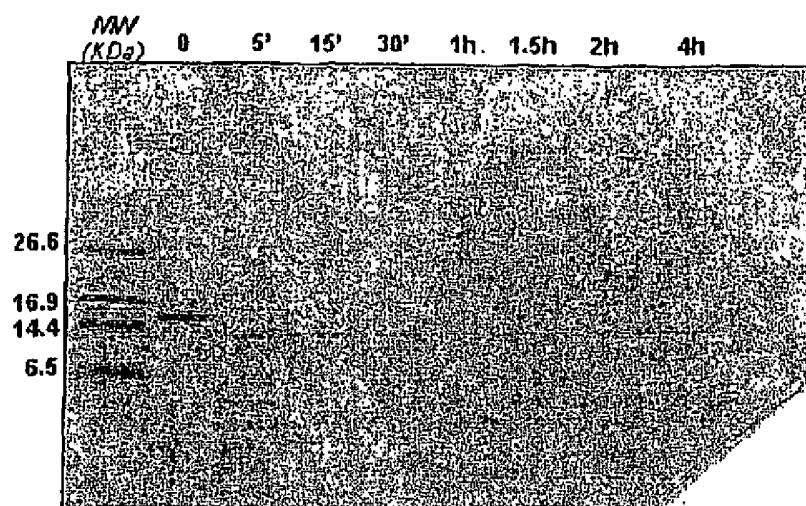


Figura 9.59

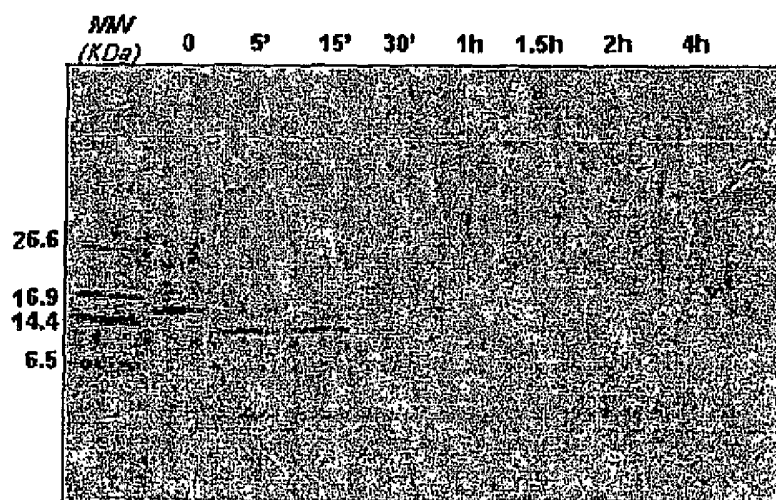


Figura 9.60

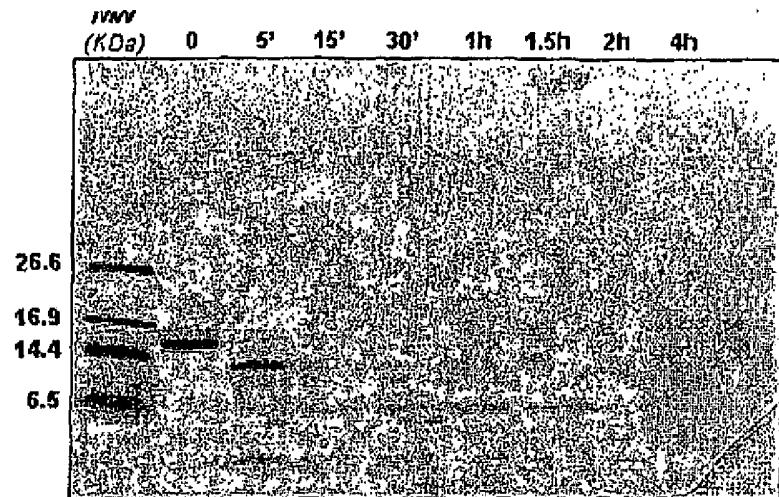


Figura 9.61

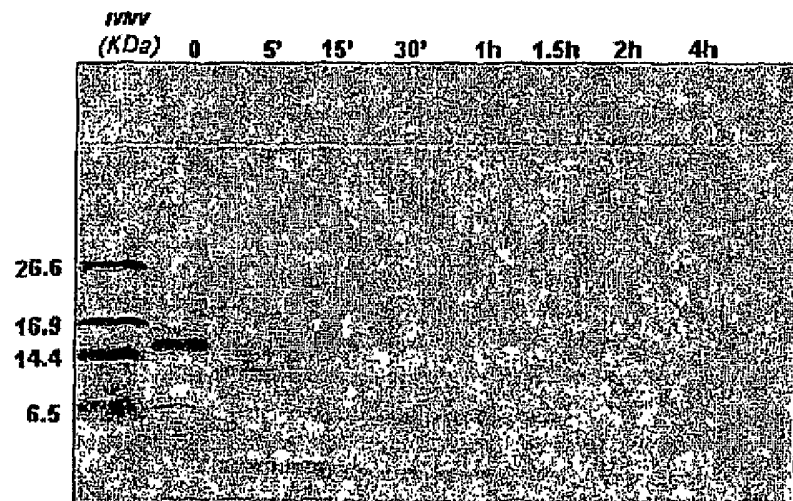


Figura 9.62

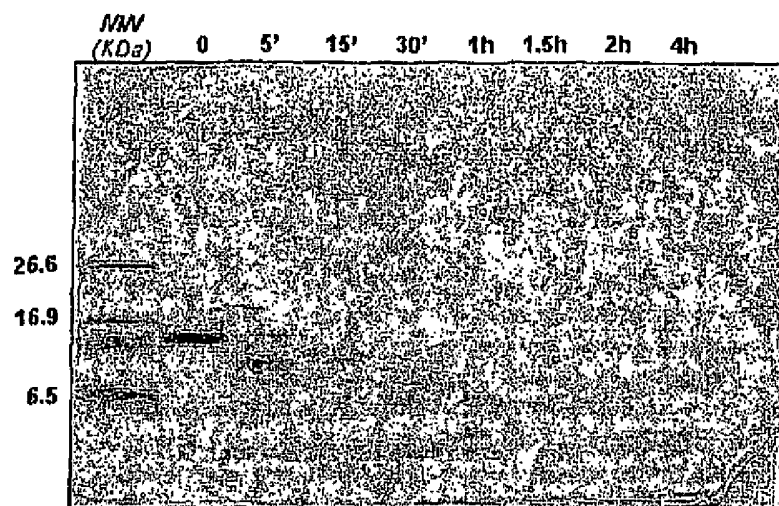


Figura 9.63

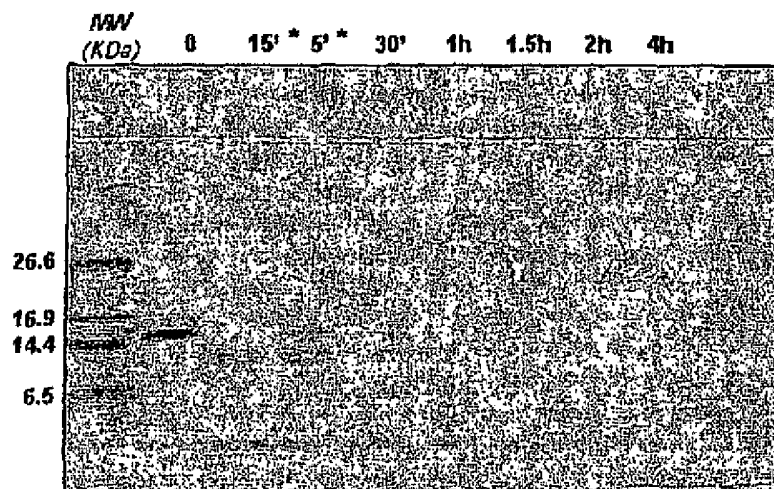


Figura 9.64

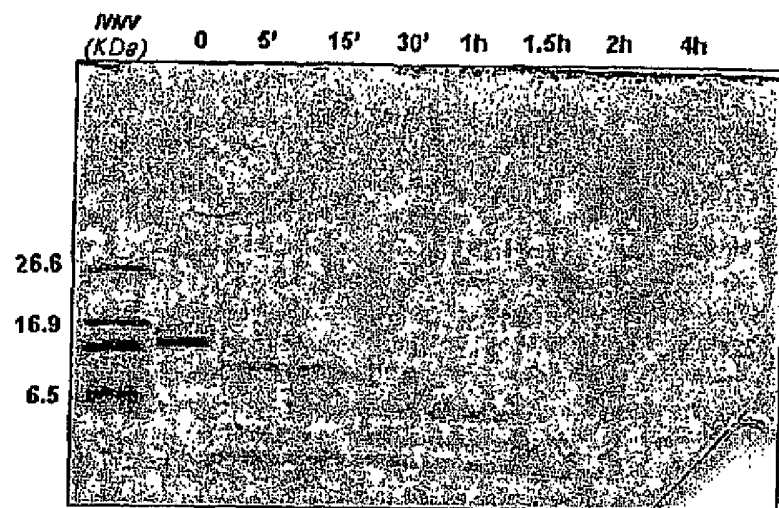


Figura 9.65

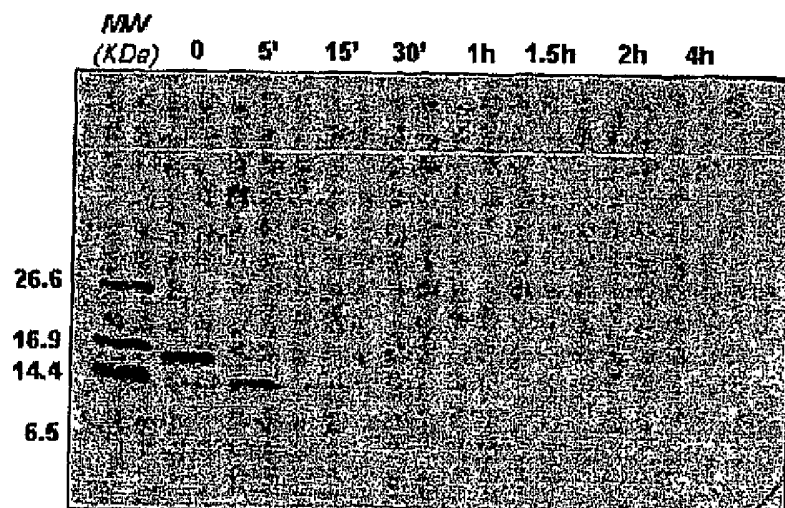


Figura 9.66

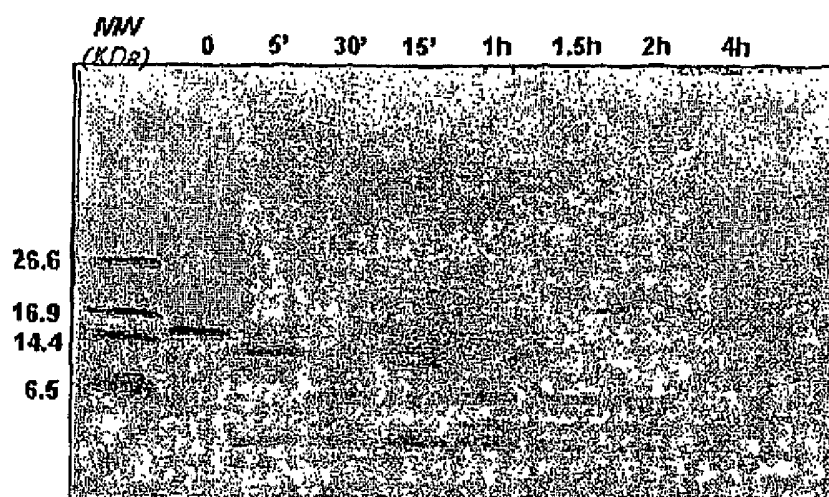


Figura 9.67

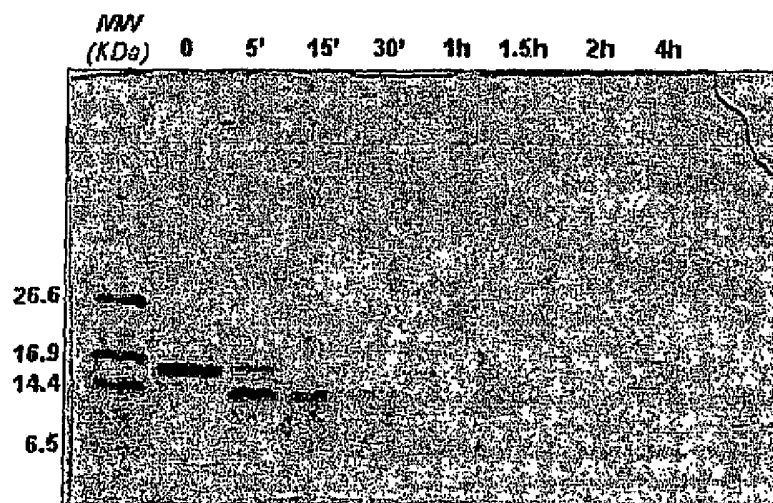


Figura 10: Tabela resumo da resistência à protease de CT500 e variantes

Variantes	Pontos no tempo							
	0	5'	15'	30'	1h	1.5h	2h	4h
CT500	x	x	x	x				
CT501	x	x	x	x				
CT502	x	x	x	x				
CT503	x	x	x	x				
CT504	x	x	x					
CT505	x	x	x	x				
CT506	x	x	x					
CT507	x	x						
CT508	x	x	x	x				
CT509	x	x	x					
CT510	x	x	x	x				
CT511	x	x	x	x				
CT512	x	x	x	x				
CT513	x	x	x	x				
CT514	x	x	x	x	x			
CT515	x	x	x	x	x	x		
CT516	x	x	x	x	x	x		
CT517	x	x	x	x	x	x		
CT518	x	x	x	x	x	x		
CT519	x	x	x					
CT520	x	x	x	x				
CT521	x	x	x	x	x			
Variantes	Pontos no tempo							
	0	5'	15'	30'	1h	1.5h	2h	4h
CT522	x	x	x	x	x			
CT523	x	x	x	x	x			
CT524	x	x	x	x	x	x		
CT525	x	x	x	x				
CT526	x	x	x	x	x			
CT527	x	x	x	x	x	x		
CT528	x	x	x	x	x	x		
CT529	x	x	x	x				
CT530	x	x	x	x	x	x		
CT531	x	x	x	x	x	x		
CT532	x	x	x	x	x			
CT533	x	x	x	x	x	x	x	
CT534	x							
CT535	x	x	x	x	x			
CT536	x	x	x	x				
CT537	x	x	x	x	x	x	x	
CT538	x	x	x	x				
CT539	x	x	x	x	x	x		
CT540	x	x	x	x	x			
CT541	x	x	x	x				
CT542	x							
CT543	x	x	x	x				
CT544	x	x	x	x				
CT545	x	x	x					
CT546	x	x	x					
CT547	x	x	x	x				
CT548	x	x						
CT549	x	x						
CT550	x	x	x					
CT551	x	x						
CT552	x	x	x	x				
CT553	x	x	x	x				
CT554	x	x						

Figura 10 (continuação)

Variantes	Pontos no tempo							
CT555	x							
CT556	x							
CT557	x	x						
CT558	x	x						
CT559	x	x	x	x	x			
CT560	x	x	x	x				
CT561	x	x	x	x				
CT562	x	x	x	x				
CT563	x	x	x	x				
CT564	x	x	x	x				
CT565	x	x	x	x				
CT566	x	x	x	x				
CT567	x	x	x	x				

Figura 11

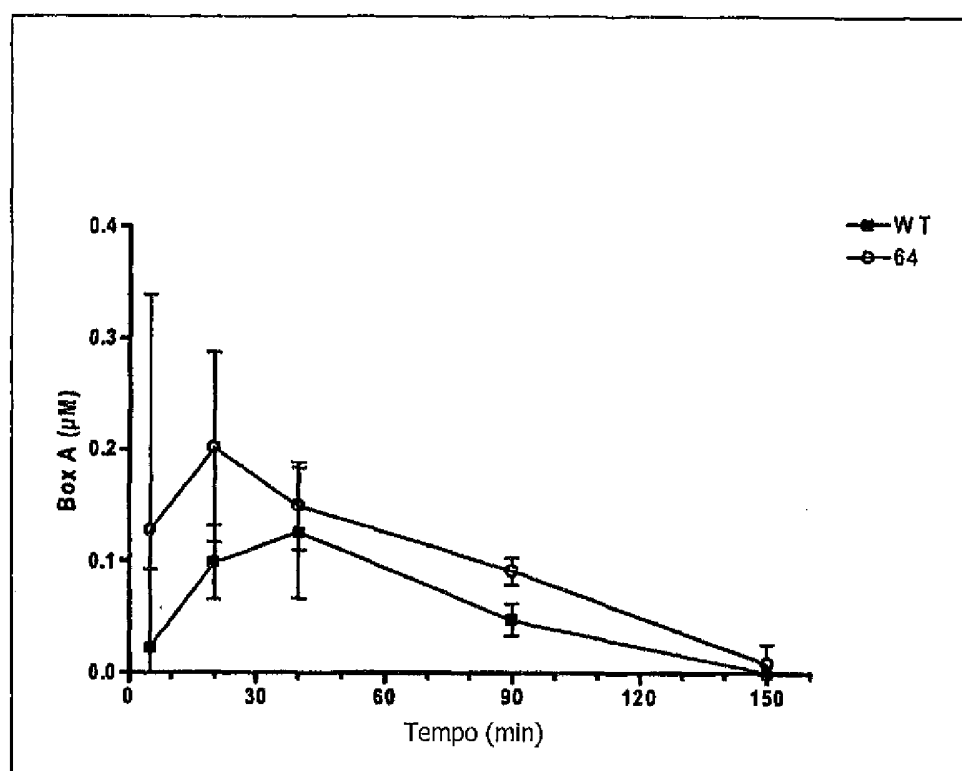
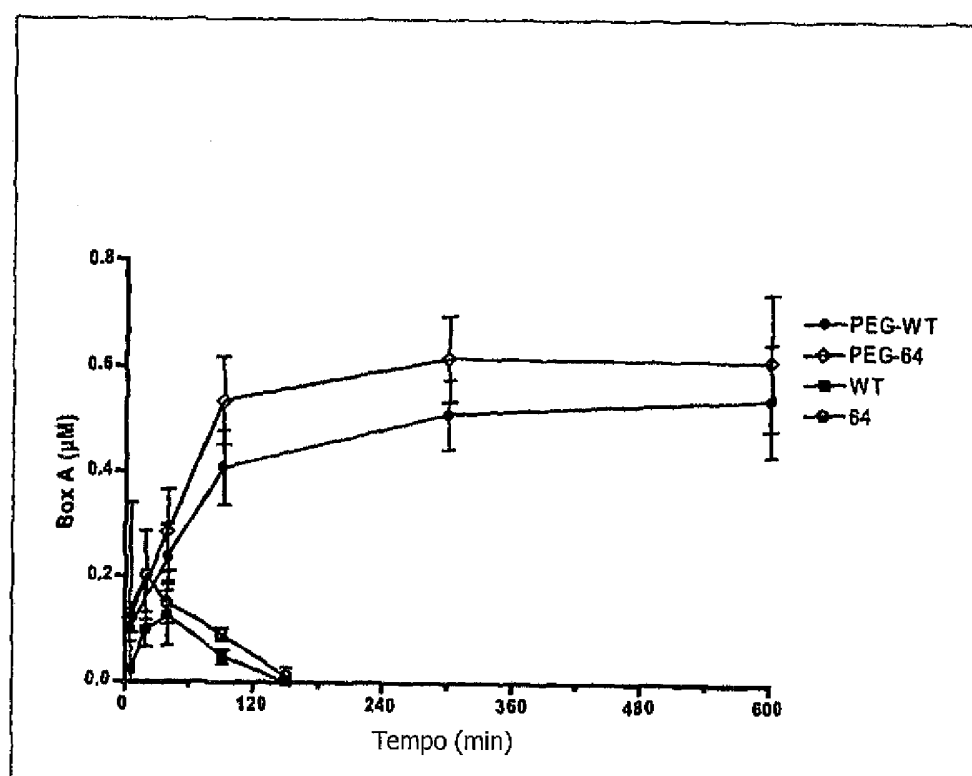


Figura 12





European Patent Office
Postbus 5818
2280 HV RIJSDWIJK
NETHERLANDS
Tel. +31 (0)70 340-2040
Fax +31 (0)70 340-3016



Weiss, Wolfgang
Weickmann & Weickmann
Patentanwälte
Postfach 86 08 20
81635 München
ALLEMAGNE

For any questions about
this communication:

Tel.: +31 (0)70 340 45 00

Date
19.04.11

Reference 38629PEPWO	Application No./Patent No. 07818168.2 - 1212 / 2068935
Applicant/Proprietor Creabilis Therapeutics s.r.l.	

Communication

concerning the registration of amendments relating to

- ☐ a transfer (R. 22 and 85 EPC)
- ☒ entries pertaining to the applicant / the proprietor (R. 143(1)(f) EPC)

As requested, the entries pertaining to the applicant of the above-mentioned European patent application / to the proprietor of the above-mentioned European patent have been amended to the following:

AT BE BG CH CY CZ DE DK EE ES FI FR GB GR HU IE IS IT LI LT LU LV MC
MT NL PL PT RO SE SI SK TR
Creabilis Therapeutics s.r.l.
BioIndustry Park,
Via Ribes 5
10010 Colletterto Giacosa (TO)/IT

The registration of the changes has taken effect on 12.04.11.

In the case of a published application / a patent, the change will be recorded in the Register of European Patents and published in the European Patent Bulletin (Section I.12 / II.12).

Your attention is drawn to the fact that, in the case of the registration of a transfer, any automatic debit order only ceases to be effective from the date of its express revocation (cf. point 14(c) of the Arrangements for the automatic debiting procedure, Supplement to OJ EPO 3/2009).

For the Examining Division



Client Data Registration Tel.: +49 (0)89 2399 2780
--