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

(21) **PI0620505-4 A2**

* B R P I 0 6 2 0 5 0 5 A 2 *

(22) Data de Depósito: 01/12/2006
(43) Data da Publicação: 29/06/2010
(RPI 2060)

(51) Int.Cl.:
C07K 16/32
C40B 30/04
C40B 40/08

(54) Título: **POLIPEPTÍDEOS, ANTICORPO, POLIPEPTÍDEO DE FUSÃO, COMPOSIÇÃO, POLINUCLEOTÍDEO, VETOR, CÉLULA HOSPEDEIRA, MÉTODO DE PRODUÇÃO DE UM POLIPEPTÍDEO, BIBLIOTECA DE POLIPEPTÍDEOS, MÉTODOS PARA GERAR UMA COMPOSIÇÃO, MÉTODO PARA A SELEÇÃO DE UM DOMÍNIO VARIÁVEL LIGANTE AO ANTÍGENO, MÉTODO PARA SELECIONAR POLIPEPTÍDEOS, MÉTODO PARA ISOLAR UM OU MAIS POLIPEPTÍDEOS, MÉTODO PARA O TRATAMENTO DE CÂNCER E MÉTODO PARA TRATAR**

(30) Prioridade Unionista: 02/12/2005 US 60/742,185, 22/06/2005 US 60/805,553

(73) Titular(es): Genentech, Inc

(72) Inventor(es): Frederic A. Fellouse, Sachdev S. Sidhu, Sara C. Birtalan

(74) Procurador(es): Paola Calabria Mattioli

(86) Pedido Internacional: PCT US2006046046 de 01/12/2006

(87) Publicação Internacional: WO 2007/094842de 23/08/2007

(57) Resumo: A invenção fornece anticorpos ou fragmentos destes ligantes ao antígeno para DR5 e HER-2. Os anticorpos e/ou fragmentos destes ligantes ao antígeno consistem de variantes de CDR que compreende uma diversidade de seqüências de aminoácidos altamente restritas. A invenção fornece também estes polipeptídeos como polipeptídeos de fusão para polipeptídeos heterólogos, tais como, pelo menos uma porção do fago ou proteínas da cápside viral, marcadores e ligantes. Além disso, fornece composições e métodos de utilização para o tratamento do câncer e de doenças autoimunes relacionadas.

Pet nº 018080047843/SP
(29107108)
PI0620505-4

"POLIPEPTÍDEOS, ANTICORPO, POLIPEPTÍDEO DE FUSÃO, COMPOSIÇÃO, POLINUCLEOTÍDEO, VETOR, CÉLULA HOSPEDEIRA, MÉTODO DE PRODUÇÃO DE UM POLIPEPTÍDEO, BIBLIOTECA DE POLIPEPTÍDEOS, MÉTODOS PARA GERAR UMA COMPOSIÇÃO, MÉTODO PARA A SELEÇÃO DE UM DOMÍNIO VARIÁVEL LIGANTE AO ANTÍGENO, MÉTODO PARA SELECIONAR POLIPEPTÍDEOS, MÉTODO PARA ISOLAR UM OU MAIS POLIPEPTÍDEOS, MÉTODO PARA O TRATAMENTO DE CÂNCER E MÉTODO PARA TRATAR"

Este é um pedido não provisório que reivindica prioridade para a patente US número de série 60/742185 depositada em 2 de Dezembro de 2005 e Patente US número de série 60/805553 depositada em 22 de junho de 2006, do qual todos os pedidos são incorporados ao presente pela referência.

CAMPO DA INVENÇÃO

A presente invenção refere-se a variantes de CDR altamente diversificadas utilizando repertórios de aminoácido altamente restritos, e bibliotecas contendo uma variedade de tais seqüências. A invenção também se refere à polipeptídeos de fusão contendo estes variantes de CDR. A invenção também se refere aos métodos e composições úteis para a identificação de novos polipeptídeos de ligação que podem ser utilizados terapeuticamente ou como reagentes.

ANTECEDENTES DA INVENÇÃO

A tecnologia de exibição por fagos tem fornecido uma poderosa ferramenta para gerar e selecionar novas proteínas que se ligam a um ligante, tais como um antígeno. O uso de técnicas de exibição por fago permite a geração de grandes bibliotecas de variantes de proteínas que podem ser rapidamente selecionadas para aqueles que se ligam a seqüências de um antígeno alvo com grande afinidade. Ácidos nucléicos codificando polipeptídeos variantes são fundidos a uma seqüência de ácidos nucléicos que

codificam uma proteína da cápside viral, tais como a proteína do gene III ou a proteína do gene VIII. Têm sido desenvolvidos sistemas de exibição por fago monovalente no qual as seqüências de ácidos nucléicos que codificam uma proteína ou polipeptídeo são fundidas a uma seqüência de ácidos nucléicos que codifica uma porção da proteína do gene III (Bass, S., *Proteins*, 8:309 (1990); Lowman e Wells, *Methods: A Companion to Methods in Enzymology*, 3:205 (1991)). Em um sistema de exibição por fagos monovalentes, o gene de fusão é expresso em níveis baixos e as proteínas do gene III do tipo selvagem são também expressas a fim de que a infecciosidade das partículas seja mantida. Métodos para gerar bibliotecas de peptídeo e a seleção dessas bibliotecas têm sido divulgados em muitas patentes (por exemplo, Patente US 5.723.286, Patente US 5.432.018, Patente US 5.580.717, Patente US 5.427.908 e Patente US 5.498.530).

A demonstração de expressão de peptídeos sobre a superfície de fagos filamentosos e expressão de fragmentos de anticorpos funcionais no periplasma da *E. coli* foi importante no desenvolvimento de anticorpos de bibliotecas de exibição por fagos Smith *et al., Science* (1985), 228:1315; Skerra e Pluckthun, *Science* (1988), 240:1038). Bibliotecas de anticorpos ou antígenos que se ligam a polipeptídeos foram preparados de várias maneiras, incluindo a alteração de um único gene, por inserção aleatória de seqüências de DNA ou por clonagem de uma família de genes relacionados. Métodos para a apresentação de fragmentos que se ligam a anticorpos ou antígenos utilizando exibição por fago foram descritos nas Patentes US 5750373, US 5733743, US 5837242, US 5969108, US 6172197, US 5580717 e US 5658727. A biblioteca é então selecionada para expressão de anticorpos ou antígenos ligantes às proteínas com as características desejadas.

A tecnologia de exibição por fagos tem várias vantagens sobre a tecnologia convencional com hibridoma e métodos recombinantes de

preparação de anticorpos com as características desejadas. Esta tecnologia permite o desenvolvimento de grandes bibliotecas de anticorpos com diversas seqüências em menos tempo e sem a utilização de animais. A preparação de hibridomas ou de anticorpos humanizado pode facilmente exigir vários meses de preparação. Além disso, uma vez que não é necessária uma imunização, anticorpos de bibliotecas de fagos podem ser gerados por antígenos tóxicos ou que possuem baixa antigenicidade (Hogenboom, *Immunotechniques* (1988), 4:1-20). Bibliotecas anticorpos de fagos também podem ser utilizadas para gerar e identificar novos anticorpos humanos.

Anticorpos tornaram-se muito úteis como agentes terapêuticos para uma grande variedade de condições. Por exemplo, anticorpos humanizado contra HER-2, um antígeno tumoral, útil no diagnóstico e tratamento do câncer. Outros anticorpos, como anticorpos anti-INF-γ, são úteis no tratamento de condições inflamatórias, como a doença de Crohn. Bibliotecas de exibição por fagos têm sido usadas para gerar anticorpos humanos a partir de humanos imunizados e não-imunizados, seqüências de linhagens percursoras, células B *naives* e repertórios de Ig (Barbas & Burton, *Trends Biotech* (1996), 14:230; Griffiths *et al., EMBO J.* (1994), 13:3245; Vaughan *et al., Nat. Biotech.* (1996), 14:309; Winter patente EP 0368.684 Bl). Bibliotecas de antígenos ligantes *naives* ou não imunes, foram gerados usando uma variedade de tecidos linfóides. Algumas destas bibliotecas são disponíveis comercialmente, como aquelas desenvolvidas pela *Cambridge Antibody Technology and Morphosys* (Vaughan *et al., Nature Biotech* 14:309 (1996); Knappik *et al., J. Mol. Biol.* 296:57 (1999)). No entanto, muitas destas bibliotecas têm a diversidade limitada.

A capacidade de identificar e isolar anticorpos de alta afinidade em uma biblioteca de exibição por fago é importante para identificar novos anticorpos humanos para fins terapêuticos. O isolamento de anticorpos de alta

afinidade em uma biblioteca está tradicionalmente associado por ser dependente, pelo menos em parte, da dimensão da biblioteca, da eficiência da produção em células bacterianas e da diversidade da biblioteca. Vide, por exemplo, Knappik *et al., J. Mol. Biol.* (1999), 296:57. A dimensão da biblioteca é diminuída pela ineficiência de produção, devido o enovelamento incorreto da proteína do anticorpo ou do antígeno de ligação e a presença de *códons* de parada. A expressão em células bacterianas pode ser inibida se o anticorpo ou o domínio do antígeno de ligação não está devidamente dobrado. Expressão pode ser melhorada por mutações nos resíduos e modificações da interface variável / constante, ou em resíduos do CDR selecionados. (Deng *et al., J. Biol. Chem.* (1994), 269:9533, Ulrich *et al., PNAS* (1995), 92:11907-11911; Forsberg *etal., J. Biol. Chem.* (1997) , 272: 12430). A seqüência da região estrutural é um fator na prestação para o enovelamento adequado quando as bibliotecas de anticorpo de fagos são produzidas em células bacterianas.

A geração de uma biblioteca diversificada de anticorpos ou proteínas de antígenos ligantes também é importante para isolamento de anticorpos de alta afinidade. Bibliotecas com diversificações em CDRs limitados foram gerados usando uma variedade de abordagens. Vide, por exemplo, Tomlinson, *Nature Biotech.* (2000), 18:989-994. As regiões CDR3 são de interesse, em parte porque muitas vezes encontram-se participantes da ligação ao antígeno. As regiões CDR3 na cadeia pesada variam muito de tamanho, seqüência e conformação estrutural.

Outros também têm gerado uma diversidade pela randomização de regiões CDR variáveis das cadeias leves e pesadas utilizando todos os 20 aminoácidos de cada posição. Pensou-se que utilizando todos os 20 aminoácidos teria como resultado uma grande diversidade de seqüências de anticorpos variantes e aumentaria a chance de identificar novos anticorpos. (Barbas, *PNAS.*, 91:3809 (1994); Yelton, *DE, J. Immunology*, 155:1994 (1995);

Jackson, *JR, J. Immunology*, 154:3310 (1995) e Hawkins, RE, *J. Mol. Biology*, 226:889 (1992)).

Também existem tentativas de criar diversidade pela restrição do grupo de substituições de aminoácido em alguns CDRs de modo a refletir a distribuição de aminoácidos em anticorpos que ocorrem naturalmente. Ver, Garrard & Henner, *Gene* (1993), 128:103; Knappik *et al., J. Mol. Biol.* (1999), 296:57. No entanto, estas tentativas têm tido sucesso variado e não foram aplicadas de forma sistemática e quantitativa. Criando diversidade nas regiões CDR ao mesmo tempo minimizando o número de mudanças de aminoácido tem sido um desafio. Além disso, em alguns casos, uma vez que uma primeira biblioteca foi gerada de acordo com um conjunto de critérios, pode ser desejável aumentar ainda mais a diversidade da primeira biblioteca. No entanto, isto requer que a primeira biblioteca tenha diversidade suficiente e ainda permaneça suficientemente pequena em dimensão, bem como uma maior diversidade pode ser introduzida sem limitações práticas substancialmente superiores, tais como rendimento, etc.

Alguns grupos têm relatado em análises teóricas e experimentais do número mínimo do repertório de aminoácido que é necessário para a geração de proteínas. No entanto, estas análises foram, em geral, limitadas no seu escopo e natureza, e questões permaneceram relativas quanto à viabilidade e aplicabilidade da produção de polipeptídeos com funções complexas utilizando um conjunto restrito de tipos de aminoácido. Vide, por exemplo, Riddle *et al.*, *Nat. Struct. Biol.* (1997), 4(10):805-809; Shang *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (1994), 91:8373-8377; Heinz *et al.*, *Proc. Natl Acad. Sci. USA* (1992), 89:3751-3755; Regan & Degrado, *Science* (1988), 241:976-978; Kamteker *et al.*, *Science* (1993), 262:1680-1685; Wang & Wang, *Nat. Struct. Biol.* (1999), 6(11):1033-1038; Xiong *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (1995), 92:6349-6353; Heinz *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (1992), 89:3751-

3755; Cannata *et al.*, *Bioinformatics* (2002), 18(8):1102-1108; Davidson *et al.*, *Nat. Struct. Biol.* (1995), 2(10):856-863; Murphy *et al.*, *Prot. Eng.* (2000), 13(3):149-152; Brown & Sauer, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (1999), 96:1983-1988; Akanuma *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci.* (2002), 99(21):13549-13553; Chan, *Nat. Struct. Biol.* (1999), 6(11):994-996.

Assim, permanece a necessidade de melhorar os métodos de geração de bibliotecas que possuem um grau suficiente de diversidade de seqüência, ainda são suficientemente condescendentes para manipulações adicionais direcionadas a maior diversificação da expressão de alto rendimento, etc. A presente invenção descrita satisfaz essa necessidade e fornece outros benefícios.

DESCRIÇÃO RESUMIDA DA INVENÇÃO

A presente invenção proporciona métodos simplificados e flexíveis para produzir polipeptídeos que compreendem de CDRs variantes que constam de seqüências com diversidade restrita que ainda conservam a capacidade se ligar ao antígeno alvo. Ao contrário dos métodos convencionais que se baseiam na proposição de que a diversidade adequada dos ligantes ao antígeno alvo podem ser gerados somente se um determinado CDR (s), ou todos os CDRs são diversificados e, ao contrário das noções convencionais de que a diversidade adequada é dependente de uma ampla gama de substituições de aminoácidos (geralmente pela substituição de todas ou da maior parte dos 20 aminoácidos), a invenção fornece métodos capazes de gerar polipeptídeos ligantes ao alvo de alta qualidade que não são necessariamente dependente de uma diversificação particular de CDR(s) ou a um determinado número de CDRs de um polipeptídeo de referência ou anticorpo fonte. A invenção é baseada, pelo menos em parte, sobre o surpreendente e inesperado achado de que bibliotecas altamente diversificadas de polipeptídeos funcionais que incluem de alta qualidade capazes de se ligar

ao antígeno podem ser gerados por um número de diversificação mínima de posições de aminoácidos com um número muito restrito de resíduos de aminoácidos. Os métodos da invenção são rápidos, convenientes e flexíveis, baseados na utilização de um conjunto de códons restrito que codificam um número reduzido de aminoácidos. A diversidade da seqüência restrita, e, portanto, geralmente menor tamanho da população (por exemplo, bibliotecas) de polipeptídeos gerados pelos métodos da invenção permite uma maior diversificação destas populações, sempre que necessária ou desejada. Esta é uma vantagem geralmente não fornecida pelos métodos convencionais. Polipeptídeos ligantes candidatos gerados pela invenção possuem características de ligação ao antígeno de alta qualidade e têm características estruturais que prevêem um alto rendimento de produção em cultura celular. A invenção fornece métodos para gerar esses polipeptídeos de ligação, métodos de utilização desses polipeptídeos e composições contendo os mesmos.

Em um aspecto, a invenção fornece polipeptídeos de fusão compreendendo CDR(s) diversificada e uma seqüência de polipeptídeo heteróloga (em certos exemplos de realização, com pelo menos uma porção de um polipeptídeo viral), como polipeptídeo único e como membro de uma pluralidade de polipeptídeos único que são candidatos a ligantes aos alvos de interesse. Composições (tais como bibliotecas) compreendendo tais polipeptídeos encontram utilização em uma variedade de aplicações, por exemplo, como *pool* de polipeptídeos imunoglobulinas candidatos (por exemplo, anticorpos e fragmentos de anticorpos) que se ligam aos alvos de interesse. Tais polipeptídeos também podem ser gerados usando moléculas-matriz "*scaffolds*" não imunoglobulinas (por exemplo, proteínas, tais como hormônio de crescimento humano e etc.). A invenção abrange vários aspectos, incluindo polinucleotídeos e polipeptídeos produzidos de acordo com os métodos da invenção e de sistemas, kits e artigos manufaturados para praticar

os métodos da invenção, e/ou utilização dos polipeptídeos / polinucleotídeos e/ou composições da invenção.

Em um aspecto, a invenção fornece um método para gerar um polipeptídeo incluindo pelo menos um, dois, três, quatro, cinco ou todos os CDRs variantes selecionados entre grupo constituído por H1, H2, H3, L1, L2 e L3, onde o dito polipeptídeo é capaz de se ligar a um antígeno alvo de interesse, o dito método compreende em identificar, pelo menos, um (ou qualquer número até o todo) solvente acessível e a posição do aminoácido altamente diversificado em uma referência CDR correspondente à variante de CDR, e; (ii) variando o aminoácido no solvente acessível e posição altamente diversificada, gerando diversos exemplares de CDR variante utilizando um conjunto de códons restrito (a definição de "conjunto de códons restrito" é especificada abaixo).

Diversos aspectos e exemplos de realização dos métodos da invenção são úteis para a produção e/ou utilização de um *pool* contendo uma pluralidade de polipeptídeos da invenção, em especial para a seleção e identificação de ligantes candidatos aos antígenos alvo de interesse. Por exemplo, a invenção fornece um método para gerar uma composição que compreende uma pluralidade de polipeptídeos, cada polipeptídeo incluindo pelo menos um, dois, três, quatro, cinco ou todos variantes de CDR selecionados de entre o grupo de CDRs constituído por H1, H2, H3, L1, L2 e L3, onde estes polipeptídeo são capazes de se ligar a um antígeno alvo de interesse, o dito método compreende em identificar, pelo menos, um (ou qualquer número até o todo) solvente acessível e posição de aminoácido altamente diversificada em uma referência CDR correspondente à variante de CDR; e (ii) variando o aminoácido no solvente acessível e a posição altamente diversificada, gerando diversos exemplares de variante de CDR utilizando um conjunto de códon restrito; onde uma pluralidade de polipeptídeos são gerados pela ampliação de

um polinucleotídeo molde com um conjunto de oligonucleotídeos constando de uma degenerescência altamente restritiva na seqüência que codifica um aminoácido variante, no qual a dita degenerescência altamente restritiva reflete o número limitado de seqüências de códons do conjunto de códon restrito.

Em outro exemplo, a invenção fornece um método que compreende a construção de um vetor de expressão contendo uma seqüência polinucleotídica que codifica uma cadeia leve, uma cadeia pesada ou ambos os domínios variáveis das cadeias leves e pesadas de um anticorpo fonte incluindo pelo menos um, dois , três, quatro, cinco ou todos os CDRs selecionados do grupo constituído por CDR L1, L2, L3, H1, H2, H3 e mutando, pelo menos, um, dois, três, quatro, cinco ou todos os CDRs do anticorpo fonte em pelo menos um (ou qualquer número até todos) solvente acessível e posição de aminoácido altamente diversificado utilizando um conjunto de códon restrito.

Em outro exemplo, a invenção fornece um método que inclui: a construção de uma biblioteca de fago ou partículas de fagomídeo que exibem uma pluralidade de polipeptídeos da invenção; expondo a biblioteca de partículas com um antígeno alvo em condições adequadas para a ligação das partículas ao antígeno alvo; e separando as partículas que se ligam a partir da aquelas que não se ligam ao antígeno.

Em um dos métodos da invenção descrito no presente, um solvente acessível e/ou posição de aminoácido altamente diversificado pode ser qualquer posição que atendam aos critérios como descrito no presente, em particular qualquer combinação das posições como descrito no presente, por exemplo, qualquer combinação de posições de polipeptídeos descritas para a invenção (tal como, descrito em maiores detalhes no presente). As variantes de aminoácido adequadas podem ser quaisquer que atendam aos critérios como descrito no presente, por exemplo, os aminoácidos variantes nos polipeptídeos da invenção, como descritos em maior detalhe abaixo.

O desenvolvimento de variedades de CDRs pode envolver o desenvolvimento de diversidade no comprimento e / ou na seqüência do CDR. Por exemplo, o CDRH3 pode ser diversificado no comprimento, por exemplo, 7 a 21 aminoácidos de comprimento, e/ou na sua seqüência, por exemplo, pela variação altamente diversificada e/ou pela posição do solvente acessível com os aminoácidos codificados por um conjunto de códons restrito. Em algumas realizações, uma porção do CDRH3 tem um comprimento variando de 5 a 21, 7 a 20, 9 a 15, ou 11 a 13 aminoácidos, e tem uma variação de aminoácido em uma ou mais posições codificadas por um conjunto de códons restrito que codificam um número limitado de aminoácidos como, por exemplo, o conjunto de códons restrito que codificam não mais que 19, 15, 10, 8, 6, 4 ou 2 aminoácidos. Em alguns exemplos, a extremidade C- terminal tem uma seqüência de aminoácidos AM, AMDY, ou DY.

Em alguns exemplos de realização, os polipeptídeos da invenção podem estar em uma variedade de formas, desde que a função de ligação ao polipeptídeos estiver mantida. Em alguns exemplos de realização, um polipeptídeo da invenção é um polipeptídeo de fusão (ou seja, uma fusão de duas ou mais seqüências de polipeptídeos heterólogas). Polipeptídeos com muitas CDRs de acordo com a invenção pode ser preparada como uma fusão de polipeptídeos de pelo menos uma porção de uma proteína da cápside viral, por exemplo, para uso na exposição por fagos. Proteínas da cápside viral que podem ser utilizadas para a exibição dos polipeptídeos da invenção compreendem proteínas p III, proteína principal da cápside pVIII, Soc (fago T4), Hoc (fago T4), gpD (fago lambda), pVI, ou variantes ou fragmentos destes. Em alguns exemplos de realização, o polipeptídeo é fundido a pelo menos uma porção de uma proteína de cápside viral, como uma proteína da cápside viral selecionada a partir do grupo, constituído por, pIII, pVIII, Soc, Hoc, gpD, pVI, e variantes ou fragmentos destes.

Em alguns exemplos de realização, na qual o polipeptídeo com CDRs diversificados é um ou mais domínio variável de anticorpo, o domínio variável de anticorpo pode ser exibido na superfície do vírus de várias formas, incluindo ScFv, Fab, ScFv2, F(ab')2 e F(ab)2-. Para a exposição dos polipeptídeos de forma bivalente, a proteína de fusão, em certos exemplos inclui um domínio de dimerização. O domínio de dimerização pode incluir uma seqüência de dimerização e/ou uma seqüência que inclua um ou mais resíduos cisteína. O domínio de dimerização pode estar ligado, direta ou indiretamente, à extremidade C-terminal de um domínio variável de cadeia pesada ou domínio constante (por exemplo, CH1). A estrutura do domínio de dimerização pode ser variada, dependendo se o domínio variável do anticorpo é produzido como um componente da proteína de fusão com o componente da proteína da cápside viral (por exemplo, sem um códon de parada após o domínio de dimerização) ou se o domínio variável do anticorpo é produzido predominantemente sem o componente da proteína da cápside viral (por exemplo, com um códon de parada após o domínio de dimerização). Quando o domínio variável do anticorpo é produzido predominantemente como uma proteína de fusão com o componente da proteína da cápside viral, uma ou mais ligações de dissulfeto e/ou seqüência de dimerização única fornece uma exibição bivalente. Para os domínios variáveis do anticorpo predominantemente produzidos não sendo fundidos a um componente da proteína da cápside viral (por exemplo, com um códon de parada âmbar), o domínio de dimerização pode incluir tanto um resíduo cisteína quanto uma seqüência de dimerização.

Além disso, opcionalmente, um polipeptídeo de fusão pode incluir um marcador que pode ser útil para a purificação, detecção e/ou rastreio, tais como, FLAG, poli-his, *gD tag*, c-myc, proteína fluorescente ou B-galactosidase. Em um exemplo de realização, um polipeptídeo de fusão compreende a fusão de um domínio constante ou variável da cadeia leve a um polipeptídeo marcado.

Em outro aspecto da invenção, um polipeptídeo, tal como um domínio variável de anticorpo, é obtido a partir de uma única fonte ou molécula molde. A fonte ou molécula molde pode ser selecionada ou desenvolvida para as características tais como o bom rendimento e estabilidade quando produzida em cultura de células eucarióticas ou procarióticas e/ou para acomodar regiões CDR H3 de dimensões variáveis. A seqüência da molécula molde pode ser alterada para melhorar a enovelamento e/ou exibição de domínio variável quando apresentada como uma proteína de fusão com uma proteína da cápside do fago. Por exemplo, um anticorpo fonte pode compreender a seqüência de aminoácidos do domínio variável do anticorpo humanizado 4D5 (domínio variável da cadeia leve (Figura 1; SEQ ID No: 1)); (domínio variável da cadeia pesada (Figura 1; SEQ ID No: 2)). Por exemplo, em um domínio variável de anticorpo de cadeia leve ou pesada, resíduos da região estrutural podem ser modificados ou alterados a partir do anticorpo fonte ou molécula modelo para melhorar o enovelamento, o rendimento, a apresentação ou a afinidade do domínio variável do anticorpo. Em alguns exemplos de realização, resíduos da região estrutural são selecionados para serem modificados a partir do anticorpo fonte ou molécula molde quando o aminoácido na posição da região estrutural da molécula fonte é diferente do aminoácido ou aminoácidos comumente encontrados na posição em que ocorrem naturalmente nos anticorpos ou em um subgrupo da seqüência de consenso. Os aminoácidos nestas posições podem ser alterados pelos aminoácidos mais comumente encontrados nos anticorpos que ocorrem naturalmente ou em um subgrupo da seqüência de consenso naquela posição. Em um exemplo de realização, o resíduo da região estrutural 71 da cadeia pesada pode ser R, V ou A. Em outro exemplo, o resíduo da região estrutural 93 da cadeia pesada pode ser S ou A. Em outro exemplo ainda, o resíduo da região estrutural 94 é R, K ou T ou é codificada pelo *MRT*. Em outro exemplo, é um quadro de resíduos 93 e 94 de

resíduos quadro é ainda R. Em outro exemplo, o resíduo da região estrutural 49 da cadeia pesada pode ser alanina ou glicina. Os resíduos da região estrutural da cadeia leve também podem ser alterados. Por exemplo, o aminoácido na posição 66 poderá ser arginina ou glicina. A região estrutural para a seqüência da cadeia leve e pesada do anticorpo humanizado 4D5 do tipo selvagem são exibidas na figura 6 (SEQ ID Nos:6-9 e 10-13, respectivamente). As regiões estruturais para a seqüência da cadeia leve e pesada do anticorpo humanizado 4D5 na qual a cadeia leve está modificada na posição 66 e a cadeia pesada está modificada nas posições 71, 73, e 78 são exibidas na Figura 7 (SEQ ID Nos: 14-17 e 18-21, respectivamente).

Os métodos da invenção são capazes de gerar uma grande variedade de polipeptídeos compreende um conjunto diverso de seqüências de CDR. Em um exemplo de realização, um uma ou mais bibliotecas são formadas utilizando os métodos da invenção como descrito no presente. O As bibliotecas são selecionadas para a ligação ao antígeno alvo, por exemplo, DR5 e HER-2 humanos.

É fornecido o domínio variável de cadeia pesada da imunoglobulina randomizado para proporcionar uma diversidade. Em uma realização, um polipeptídeo compreende um domínio variável de cadeia pesada de imunoglobulina, onde:

(i) CDRH1 compreende uma seqüência de aminoácidos: G-F-X1-I-X2-X3-X4-X5-I-H (SEQ ID No: 22), no qual G é a posição 26 e X1 é a posição 28 de acordo com o sistema de numeração de Kabat; no qual X1 é selecionado a partir de S e Y; no qual X2 é selecionado a partir de Y e S; no qual, X3 é selecionado a partir de Y e S; no qual, X4 é selecionado a partir de Y e S; no qual, X5 é selecionado a partir de Y e S;

(ii) CDRH2 compreende uma seqüência de aminoácidos: X1-I-X2-P-X3-X4-G-X5-T-X6-Y-A-D-S-V-K-G (SEQ ID No: 23), no qual X1 é a posição

50, de acordo com o sistema de numeração de Kabat ; no qual, X1 é selecionado a partir de Y e S; no qual X2 é selecionado a partir de Y e S; no qual, X3 é selecionado a partir de Y e S; no qual, X4 é selecionado a partir de Y e S; no qual, X5 é selecionado a partir de Y e S, e no qual X6 selecionado a partir de Y e S; e

(iii) CDRH3 compreende uma seqüência de aminoácidos: X1-X2-X3-X4-X5-x6-X7-X8-X9-X10-X11-X12-X13-X.14-X15-X16-D-Y (SEQ ID No ED: 31), no qual, X1 é a posição 95 de acordo com o sistema de numeração de Kabat, e no qual X1 é selecionado a partir de R, Y, M; X2 é selecionado a partir de Y e R; X3 é selecionado a partir de Y, S, R, P e G, X4 é selecionado a partir de Y e S; X5 é selecionado a partir de Y, S, R e H; X6 é selecionado a partir de R, Y e S; X7 é selecionado a partir de G, Y e S; X8 é selecionado a partir de R, Y e S; X9 é selecionado a partir de G, Y e S; X10 é selecionado a partir de R, Y e S; X11 é selecionado a partir de G, Y e S; X12 é selecionado a partir de S, Y, R, G e A; X13 é selecionado a partir de G e Y; X14 é selecionado a partir de L, M, R, G e A; e X15 é selecionado a partir de G, F e L ou não está presente, e X16 é F ou não está presente.

Em outro exemplo de realização, um polipeptídeo compreende um domínio variável de cadeia pesada de imunoglobulina, onde:

(i) CDRH1 compreende uma seqüência de aminoácidos: G-F-X1-I-X2-X3-X4-X5-I-H (SEQ ID No: 22), no qual G é a posição 26 e X1 é a posição 28 de acordo com o sistema de numeração de Kabat; no qual X1 é selecionado a partir de S e Y; no qual X2 é selecionado a partir de Y e S; no qual, X3 é selecionado a partir de Y e S; no qual, X4 é selecionado a partir de Y e S; no qual, X5 é selecionado a partir de Y e S;

(ii) CDRH2 compreende uma seqüência de aminoácidos: X1-I-X2-P-X3-X4-G-X5-T-X6-Y-A-D-S-V-K-G (SEQ ID No: 23), no qual X1 é a posição 50, de acordo com o sistema de numeração de Kabat ; no qual, X1 é

selecionado a partir de Y e S; no qual X2 é selecionado a partir de Y e S; no qual, X3 é selecionado a partir de Y e S; no qual, X4 é selecionado a partir de Y e S; no qual, X5 é selecionado a partir de Y e S, e no qual X6 selecionado a partir de Y e S; e

(iii) CDRH3 compreende uma seqüência de aminoácidos: X1-X2-X3-X4-X5-x6-X7-X8-X9-X10-X11-X12-X13-X14-X15-X16-X17-X18-X19-D-Y (SEQ ID No: 24), no qual, X1 é a posição 95 de acordo com o sistema de numeração de Kabat, caracterizada pelo fato dos aminoácidos em cada uma das posições de X1-X6 serem selecionados a partir de um pool de aminoácidos numa razão molar de 50% de Y, 25% de S, e 25% de G; caracterizada pelo fato dos aminoácidos em cada uma das posições de X7-X17 serem selecionados a partir de um pool de aminoácidos numa razão molar de 50% de Y, 25% de S e 25% de G, ou não estarem presentes; no qual X18 é selecionado a partir de G e A, e no qual X19 é selecionado a partir de I, M, L e F.

Em outro exemplo de realização, um polipeptídeo compreende um domínio variável de cadeia pesada de imunoglobulina, onde:

(i) CDRH1 compreende uma seqüência de aminoácidos: G-F-X1-I-X2-X3-X4-X5-I-H (SEQ ID No: 22), no qual G é a posição 26 e X1 é a posição 28 de acordo com o sistema de numeração de Kabat; no qual X1 é selecionado a partir de S e Y; no qual X2 é selecionado a partir de Y e S; no qual, X3 é selecionado a partir de Y e S; no qual, X4 é selecionado a partir de Y e S; no qual, X5 é selecionado a partir de Y e S;

(ii) CDRH2 compreende uma seqüência de aminoácidos: X1-I-X2-P-X3-X4-G-X5-T-X6-Y-A-D-S-V-K-G (SEQ ID No: 23), no qual X1 é a posição 50, de acordo com o sistema de numeração de Kabat ; no qual, X1 é selecionado a partir de Y e S; no qual X2 é selecionado a partir de Y e S; no qual, X3 é selecionado a partir de Y e S; no qual, X4 é selecionado a partir de Y e S; no qual, X5 é selecionado a partir de Y e S, e no qual X6 selecionado a partir de Y e S; e

(iii) CDRH3 compreende uma seqüência de aminoácidos: X1-X2-X3-X4-X5-X6-X7-X8-X9-X10-X11-X12-X13-X14-X15-X16-X17-X18-X19-D-Y (SEQ ID No: 26), no qual, X1 é a posição 95 de acordo com o sistema de numeração de Kabat, caracterizada pelo fato dos aminoácidos em cada uma das posições de X1-X6 serem selecionados a partir de um pool de aminoácidos numa razão molar de 25% de Y, 50% de S, e 25% de R; caracterizada pelo fato dos aminoácidos em cada uma das posições de X7-X17 serem selecionados a partir de um pool de aminoácidos numa razão molar de 25% de Y, 50% de S e 25% de R, ou não estarem presentes; no qual, X18 é selecionado a partir de G e A; e no qual, X19 é selecionado a partir de I, M, L e F.

Em outro exemplo de realização, um polipeptídeo compreende um domínio variável de cadeia pesada de imunoglobulina, onde:

(i) CDRH1 compreende uma seqüência de aminoácidos: G-F-X1-I-X2-X3-X4-X5-I-H (SEQ ID No: 22), no qual G é a posição 26 e X1 é a posição 28 de acordo com o sistema de numeração de Kabat; no qual X1 é selecionado a partir de S e Y; no qual X2 é selecionado a partir de Y e S; no qual, X3 é selecionado a partir de Y e S; no qual, X4 é selecionado a partir de Y e S; no qual, X5 é selecionado a partir de Y e S;

(ii) CDRH2 compreende uma seqüência de aminoácidos: X1-I-X2-P-X3-X4-G-X5-T-X6-Y-A-D-S-V-K-G (SEQ ID No: 23), no qual X1 é a posição 50, de acordo com o sistema de numeração de Kabat ; no qual, X1 é selecionado a partir de Y e S; no qual X2 é selecionado a partir de Y e S; no qual, X3 é selecionado a partir de Y e S; no qual, X4 é selecionado a partir de Y e S; no qual, X5 é selecionado a partir de Y e S, e no qual X6 selecionado a partir de Y e S; e

(iii) CDRH3 compreende uma seqüência de aminoácidos: X1-X2-X3-X4-X5-X6-X7-X8-X9-X10-X11-X12-X13-X14-X15-X16-X17-X18-X19-D-Y (SEQ ID No ED: 27), no qual, X1 é a posição 95 de acordo com o sistema de

numeração de Kabat, caracterizada pelo fato dos aminoácidos em cada uma das posições de X1-X6 serem selecionados a partir de um pool de aminoácidos numa razão molar de 38% de Y, 25% de S, e 25% de G e 12% de R; caracterizada pelo fato dos aminoácidos em cada uma das posições de X7-X17 serem selecionados a partir de um pool de aminoácidos numa razão molar de 38% de Y, 25% de S, e 25% de G e 12% de R, ou não estarem presentes; no qual, X18 é selecionado a partir de G e A, e no qual, X19 é selecionado a partir de I, M, L e F.

Em outro exemplo de realização, um polipeptídeo compreende um domínio variável de cadeia pesada de imunoglobulina, onde:

(i) CDRH1 compreende uma seqüência de aminoácidos: G-F-X1-I-X2-X3-X4-X5-I-H (SEQ ID No: 22), no qual G é a posição 26 e X1 é a posição 28 de acordo com o sistema de numeração de Kabat; no qual X1 é selecionado a partir de S e Y; no qual X2 é selecionado a partir de Y e S; no qual, X3 é selecionado a partir de Y e S; no qual, X4 é selecionado a partir de Y e S; no qual, X5 é selecionado a partir de Y e S;

(ii) CDRH2 compreende uma seqüência de aminoácidos: X1-I-X2-P-X3-X4-G-X5-T-X6-Y-A-D-S-V-K-G (SEQ ID No: 23), no qual X1 é a posição 50, de acordo com o sistema de numeração de Kabat ; no qual, X1 é selecionado a partir de Y e S; no qual X2 é selecionado a partir de Y e S; no qual, X3 é selecionado a partir de Y e S; no qual, X4 é selecionado a partir de Y e S; no qual, X5 é selecionado a partir de Y e S, e no qual X6 selecionado a partir de Y e S; e

(iii) CDRH3 compreende uma seqüência de aminoácidos: X1-X2-X3-X4-X5-X6-X7-X8-X9-X10-X11-X12-X13-X14-X15-X16-X17-X18-X19-D-Y (SEQ ID No ED: 28), no qual, X1 é a posição 95 de acordo com o sistema de numeração de Kabat, caracterizada pelo fato dos aminoácidos em cada uma das posições de X1-X6 serem selecionados a partir de um pool de aminoácidos

numa razão molar de 20% de Y, 26% de S, 26% de G, 13% de R, 1% de A, 1% de D, 1% de E, 1% de F, 1% de H, 1% de I, 1% de K, 1% de L, 1% de M, 1% de N, 1% de P, 1% de Q, 1% de T, 1% de V e 1% de W; caracterizada pelo fato dos aminoácidos em cada uma das posições de X7-X17 serem selecionados a partir de um pool de aminoácidos numa razão molar de 20% de Y, 26% de S, 26% de G, 13% de R, 1% de A, 1% de D, 1% de E, 1% de F, 1% de H, 1% de I, 1% de K, 1% de L, 1% de M, 1% de N, 1% de P, 1% de Q, 1% de T, 1% de V e 1% de W, ou não estão presentes; no qual, X18 é selecionado a partir de G e A, e no qual, X19 é selecionado a partir de I, M, L e F.

Em um aspecto da invenção, a CDRH1 compreende pelo menos de uma seqüência de aminoácidos selecionada de qualquer uma das SEQs ID Nos: 524-540 e 189-294 ou pelo menos de uma seqüência de aminoácido selecionada de qualquer uma das seqüências na Figura 11A ou Figura 15. A CDRH2 compreende pelo menos de uma seqüência de aminoácidos selecionada de qualquer uma das SEQs ID Nos:.541-557 e 295-400 ou pelo menos a seqüência de aminoácidos selecionada de qualquer uma das seqüências na Figura 11A ou Figura 15. A CDRH3 compreende pelo menos de uma seqüência de aminoácidos selecionada de qualquer uma das SEQs ID Nos:.558-574 e 401-506 ou pelo menos a seqüência de aminoácidos CDRH3 selecionada de qualquer uma das seqüências na Figura 11A ou Figura 15.

Em outro aspecto da invenção, a seqüência de aminoácidos CDRH3 compreende X1 é selecionado a partir de R e Y; X3 é S; X8 é S; X9 é Y e X10 é é Y ou R. Em outro aspecto da invenção, a seqüência de aminoácidos CDRH3 compreende a seqüência de aminoácido X1-R-S-Y-R-Y-G-S-Y-X10-G-S-Y-X14-F-D-Y (SEQ ID No:575).

Em outro aspecto da invenção, o polipeptídeo se liga ao DR5 humano ou se liga DR5 humano e DR5 murino. Em um aspecto da invenção o polipeptídeo é um anticorpo.

Em uma realização, o anticorpo contém um domínio variável da cadeia pesada que compreende: i) um CDRH1 contendo uma seqüência de aminoácidos GFYISSSSIH (SEQ ID No: 576); ii) um CDRH2 contendo uma seqüência de aminoácidos SISPSSGSTYYADSVKG (SEQ NO ID: 577); e iii) um CDRH3 contendo uma seqüência de aminoácidos YRSYRYGSYYGSYGFDY (SEQ NO ID: 578). Em uma realização, o anticorpo contém um domínio variável da cadeia pesada que compreende: i) um CDRH1 contendo uma seqüência de aminoácidos GFYISSSSIH (SEQ ID No: 579); ii) um CDRH2 contendo uma seqüência de aminoácidos SISPSSGYTSYADSVKG (SEQ NO ID: 580); e iii) um CDRH3 contendo uma seqüência de aminoácidos RRSYRYGSYRGSYAFDY (SEQ NO ID: 581).

Em outro aspecto, o polipeptídeo consta adicionalmente de um domínio variável da cadeia leve, no qual:

(i) CDRL3 compreende uma seqüência de aminoácidos Q-Q-X1-X2-X3-X4-P-X5-T (ID SEQ NO: 25); no qual, X1 é a posição 91 e é selecionado a partir de Y, H e S; X2 é selecionado de Y e S; X3 é selecionado de Y, S e T; X4 é selecionado de Y, S e T, e X5 é selecionado de S, P e Y. em uma realização, um CDRL1 que possuir a seqüência de aminoácidos RASQDVNTAVA (ID SEQ NO: 29). Em uma realização, um CDRL2 que possuir a seqüência de aminoácidos SASSLYS (ID SEQ NO: 30).

Em uma realização, o anticorpo contém um domínio variável da cadeia pesada que compreende: (i) CDRH1 compreende uma seqüência de aminoácidos: G-F-X1-I-X2-X3-X4-X5-I-H (SEQ ID No: 22), no qual, X1 é a posição 28 de acordo com o sistema de numeração de Kabat e é selecionado de S e Y; X2 é selecionado a partir de S e Y; X3 é selecionado a partir de S e Y; X4 é selecionado de S e Y; X5 é selecionado de S e Y; (ii) CDRH2 compreende uma seqüência de aminoácidos: X1-I-X2-P-X3-X4-G-X5-T-X6-Y-A-D-S-V-K-G (SEQ ID No: 23), no qual, X1 é a posição 50, de acordo com o

sistema de numeração de Kabat e é selecionado a partir de S e Y; X2 é selecionado de S e Y; X3 é selecionado de S e Y; X4 é selecionado de S e Y; X5 é selecionado de S e Y, e X6 selecionado a partir de S e Y; e (iii) CDRH3 compreende uma seqüência de aminoácidos: X1-X2-X3-X4-X5-X6-X7- D-Y (SEQ ID No: 582), no qual, X1 é a posição do aminoácido 95 de acordo com o sistema de numeração de Kabat e é selecionado a partir de S e Y; X2 é selecionado a partir de S e Y e R; X3 é selecionado de S, G, Y e H; X4 é selecionado de S, G, Y e R; X5 é selecionado de G e A; X6 é selecionado de F, M, L e A; e X7 é selecionado de F, M e L ou está ausente.

Em um aspecto da invenção, a CDRH1 compreende pelo menos de uma seqüência de aminoácidos selecionada de qualquer uma das SEQs ID Nos: 189-198. A CDRH2 compreende de pelo menos uma seqüência de aminoácido selecionada de qualquer uma das SEQs ID Nos:295-304. A CDRH3 compreende pelo menos de uma seqüência de aminoácidos selecionada de qualquer uma das SEQs ID Nos: 401-410.

Em outra realização, o anticorpo contém um domínio variável da cadeia pesada que compreende: (i) CDRH1 compreende uma seqüência de aminoácidos: G-F-X1-I-X2-X3-X4-X5-I-H (SEQ ID No: 22), no qual, X1 é a posição 28 de acordo com o sistema de numeração de Kabat e é selecionado de S e Y; X2 é selecionado a partir de S e Y; X3 é selecionado a partir de S e Y; X4 é selecionado de S e Y; X5 é selecionado de S e Y; (ii) CDRH2 compreende uma seqüência de aminoácidos: X1-I-X2-P-X3-X4-G-X5-T-X6-Y-A-D-S-V-K-G (SEQ ID No: 23), no qual, X1 é a posição 50, de acordo com o sistema de numeração de Kabat e é selecionado a partir de S e Y; X2 é selecionado de S e Y; X3 é selecionado de S e Y; X4 é selecionado de S e Y; X5 é selecionado de S e Y, e (iii) CDRH3 compreende uma seqüência de aminoácidos: X1-X2-X3-X4-X5-X6-X7-X8-D-Y (SEQ ID No: 583), no qual, X1 é a posição do aminoácido 95 de acordo com o sistema de numeração de Kabat

e é selecionado a partir de Y, S e G; X2 é selecionado a partir de Y, S, G, R e A; X3 é selecionado de G, Y, S e R; X4 é selecionado de G, Y e F; X5 é selecionado de Y, S, N e G; X6 é selecionado de Y, R, H e W; e X7 é selecionado a partir de G e A; e X8 é selecionado a partir de F, M, L e I.

Em um aspecto da invenção, a CDRH1 compreende pelo menos de uma seqüência de aminoácidos selecionada de qualquer uma das SEQs ID Nos: 199-216. A CDRH2 compreende de pelo menos uma seqüência de aminoácido selecionada de qualquer uma das SEQs ID Nos: 305-322. A CDRH3 compreende pelo menos de uma seqüência de aminoácidos selecionada de qualquer uma das SEQs ID Nos: 411-428.

Em outra realização, o anticorpo contém um domínio variável da cadeia pesada que compreende:

(i) CDRH1 compreende uma seqüência de aminoácidos: G-F-X1-I-X2-X3-X4-X5-I-H (SEQ ID No: 22), no qual, X1 é a posição 28 de acordo com o sistema de numeração de Kabat e é selecionado de S e Y; X2 é selecionado a partir de S e Y; X3 é selecionado a partir de S e Y; X4 é selecionado de S e Y; X5 é selecionado de S e Y;

(ii) CDRH2 compreende uma seqüência de aminoácidos: X1-I-X2-P-X3-X4-G-X5-T-X6-Y-A-D-S-V-K-G (SEQ ID No: 23), no qual, X1 é a posição 50, de acordo com o sistema de numeração de Kabat e é selecionado a partir de S e Y; X2 é selecionado de S e Y; X3 é selecionado de S e Y; X4 é selecionado de S e Y; X5 é selecionado de S e Y, e

(iii) CDRH3 compreende uma seqüência de aminoácidos: X1-X2-X3-X4-X5-X6-X7-X8-X9-X10-X11-X12-X13-X14-X15-X16-X17-X18-X19-D-Y (SEQ ID No: 584), no qual, X1 é a posição do aminoácido 95 é selecionado a partir de Y, S, R e G; X2 é selecionado a partir de Y, S, R e G; X3 é selecionado de S, Y, G e W; X4 é selecionado de S, Y, G e Q; X5 é selecionado a partir de G, Y e S; X6 é selecionado a partir de G, Y S, R e V; X7

é selecionado a partir de S, Y, G e R; X8 é selecionado a partir de Y, S, G, R, P e V; X9 é selecionado a partir de G, A,Y,S e R; X10 é selecionado de M, F, G, Y, S e R; X11 é selecionado de A, Y, S, G e R; X12 é selecionado de I, M, F, L, A, G, S, Y, R e T; X13 é selecionado de F, M, L, G, A,Y, T E S ou não está presente; X14 é selecionado de L, M, F, I, G, Y, A e T; e X15 é selecionado de M, L, Y, G e R ou não está presente; X16 é selecionado de Y e G ou não está presente; X17 é selecionado de R, M e G ou não está presente; X18 é selecionado a partir de P e A ou não está presente; e X18 é L ou não está presente.

Em outra realização, um polipeptídeo compreende um domínio variável da cadeia pesada de imunoglobulina, no qual:

(i) CDRH1 compreende uma seqüência de aminoácidos: G-F-X1-I-X2-X3-X4-X5-I-H (SEQ ID No: 22), caracterizado pelo fato de que G é a posição 26 e X1 é a posição 28 de acordo com o sistema de numeração de Kabat; e no qual X1-X5 são aminoácidos naturalmente presentes que não a cisteína;

(ii) CDRH2 compreende uma seqüência de aminoácidos: X6-I-X7-P-X8-X9-G-X10-T-X11-Y-A-D-S-V-K-G, no qual, X6 é a posição 50 de acordo com o sistema de numeração de Kabat, e no qual, X6-X11 são aminoácidos naturalmente presentes que não a cisteína; e

(iii) CDRH3 compreende uma seqüência de aminoácidos: X12-X13-X14-X15-X16-(X17) n-X18-X19-D-Y, no qual X12 é a posição 95 de acordo com o sistema de numeração de Kabat; e no qual, n é um número adequado que manterá a atividade funcional do domínio variável da cadeia pesada; e no qual, X12-X19 são aminoácidos naturalmente presentes que não a cisteína. Em um aspecto, n é um número de 1 a 12. Em um aspecto, X1 é selecionado a partir de Y e S; X2 é selecionado a partir de Y e S; X3 é selecionado a partir de Y e S; X4 é selecionado a partir de Y e S; X5 é selecionado a partir de Y e S; e X6 é selecionado a partir de Y e S. Em um aspecto, X6 é selecionado a partir de Y e S; X7 é selecionado a partir de Y e S; X8 é selecionado a partir de Y e

S; X9 é selecionado a partir de Y e S; X10 é selecionado a partir de Y e S; e X11 é selecionado a partir de Y e S. Em um aspecto, os aminoácidos em cada uma das posições X12-X17 são selecionados a partir de um pool de aminoácidos numa razão molar de 50% de Y, 25% de S e 25% de G, e X18 é selecionado a partir de G e A, e X19 é selecionado a partir de I, M, L, e F. Em um aspecto alternativo, os aminoácidos em cada uma das posições X12-X17 são selecionados a partir de um *pool* de aminoácidos numa razão molar de 25% de Y, 50% de S e 25% de R, no qual X18 é selecionado a partir de G e A, e X19 é selecionado a partir de I, M, L, e F. Em um aspecto alternativo, os aminoácidos em cada uma das posições X12-X17 são selecionados a partir de um pool de aminoácidos numa razão molar de 38% de Y, 25% de S, 25% de G e 12% de R, no qual X18 é selecionado a partir de G e A, e X19 é selecionado a partir de I, M, L, e F. Em um outro aspecto alternativo, os aminoácidos em cada uma das posições X12-X17 são selecionados a partir de um pool de aminoácidos numa razão molar de 20% Y, 26% S, 26% G, 13% R, 1% A, 1% D, 1% E, 1% F, 1% H, 1% I, 1% K, 1% L, 1% M, 1% N, 1% P, 1% Q, 1% T, 1% V, e de 1% W; no qual, X18 é selecionada a partir de G e A; e X19 é selecionado a partir de I, M, L, e F. Em um aspecto da invenção, a CDRH1 compreende pelo menos de uma seqüência de aminoácidos selecionada de qualquer uma das SEQs ID Nos: 217-294 ou uma das seqüências CDRH1 na Figura 11. A CDRH2 compreende de pelo menos uma seqüência de aminoácido selecionada de qualquer uma das SEQs ID Nos: 323-400 ou uma das seqüências CDRH2 na Figura 11. A CDRH3 compreende pelo menos de uma seqüência de aminoácidos selecionada de qualquer uma das SEQs ID Nos: 429-506 ou uma das seqüências CDRH3 na Figura 11.

Em outra realização, é fornecido um polipeptídeo que compreende um domínio variável da cadeia pesada de imunoglobulina, no qual:

(i) CDRH1 compreende uma seqüência de aminoácidos: G-F-X1-I-X2-X3-X4-X5-I-H (SEQ ID No.: ___), caracterizado pelo fato de que G é a posição 26 e X1 é a posição 28 de acordo com o sistema de numeração de Kabat; no qual, X1-X5 são aminoácidos naturalmente presentes que não a cisteína;

(ii) CDRH2 compreende uma seqüência de aminoácidos: X6-I-X7-P-X8-X9-S-X10-T-X11-Y-A-D-S-V-K-G (SEQ ID No.: ___), no qual, X6 é a posição 50 de acordo com o sistema de numeração de Kabat, e no qual, X6-X11 são aminoácidos naturalmente presentes que não a cisteína; e

(iii) CDRH3 compreende uma seqüência de aminoácidos: X12-X13-X14-$(X15)_n$-X16-X17 (SEQ ID No.: ___), no qual X14 é a posição 95 de acordo com o sistema de numeração de Kabat; e no qual, n é um número adequado que manterá a atividade funcional do domínio variável da cadeia pesada; e no qual, X12-X17 são aminoácidos naturalmente presentes que não a cisteína. Em um aspecto, n é um número de 1 a 14. Em outro aspecto, X1 é selecionado a partir de Y e S; X2 é selecionado a partir de Y e S; X3 é selecionado a partir de Y e S; X4 é selecionado a partir de Y e S; X5 é selecionado a partir de Y e S; e X6 é selecionado a partir de Y e S. Em outro aspecto, X1 é selecionado a partir de W e S; X2 é selecionado a partir de W e S; X3 é selecionado a partir de W e S; X4 é selecionado a partir de W e S eX5 é selecionado a partir de W e S. Em outro aspecto, X1 é selecionado a partir de R e S; X2 é selecionado a partir de R e S; X3 é selecionado a partir de R e S; X4 é selecionado a partir de R e S e X5 é selecionado a partir de R e S. Em outro aspecto, X1 é selecionado a partir de F e S; X2 é selecionado a partir de F e S; X3 é selecionado a partir de F e S; X4 é selecionado a partir de F e S e X5 é selecionado a partir de F e S. Em outro aspecto, X6 é selecionado a partir de Y e S; X7 é selecionado a partir de Y e S; X8 é selecionado a partir de Y e S; X9 é selecionado a partir de Y e S; X10 é selecionado a partir de Y e S; e

X11 é selecionado a partir de Y e S. Em outro aspecto, X6 é selecionado a partir de W e S; X7 é selecionado a partir de W e S; X8 é selecionado a partir de W e S; X9 é selecionado a partir de W e S; X10 é selecionado a partir de W e S; e X11 é selecionado a partir de W e S. Em outro aspecto, X6 é selecionado a partir de R e S; X7 é selecionado a partir de R e S; X8 é selecionado a partir de R e S; X9 é selecionado a partir de R e S; X10 é selecionado a partir de R e S; e X11 é selecionado a partir de R e S. Em outro aspecto, X6 é selecionado a partir de F e S; X7 é selecionado a partir de F e S; X8 é selecionado a partir de F e S; X9 é selecionado a partir de F e S; X10 é selecionado a partir de F e S; e X11 é selecionado a partir de F e S. Em outro aspecto, X12 é selecionado a partir de Y e S; X13 é selecionado a partir de Y e S; X14 é selecionado a partir de Y e S; X15 é selecionado a partir de Y e S; X16 é selecionado a partir de G e A; e X17 é selecionado a partir de F, L, I e M. Em outro aspecto, X12 é selecionado a partir de W e S; X13 é selecionado a partir de W e S; X14 é selecionado a partir de W e S; X15 é selecionado a partir de W e S; X16 é selecionado a partir de G e A; e X17 é selecionado a partir de F, L, I e M. Em outro aspecto, X12 é selecionado a partir de R e S; X13 é selecionado a partir de R e S; X14 é selecionado a partir de R e S; X15 é selecionado a partir de R e S; X16 é selecionado a partir de G e A; e X17 é selecionado a partir de F, L, I e M. Em outro aspecto, X12 é selecionado a partir de F e S; X13 é selecionado a partir de F e S; X14 é selecionado a partir de F e S; X15 é selecionado a partir de F e S; X16 é selecionado a partir de G e A; e X17 é selecionado a partir de F, L, I e M.

Em outro aspecto, os aminoácidos em cada uma das posições de X1-X15 são selecionados a partir de S e um de A, C, F, G, I, L, N, P, R, T, W ou Y, X16 é selecionado a partir de G e A; e X17 é selecionado a partir de F, L, I, e M.

Em outro exemplo de realização, um polipeptídeo contendo um domínio variável de cadeia pesada de imunoglobulina, no qual:

(i) CDRH1 compreende uma seqüência de aminoácidos: G-F-X1-I-X2-X3-X4-X5-I-H, caracterizado pelo fato de que G é a posição 26 e X1 é a posição 28 de acordo com o sistema de numeração de Kabat; no qual, X1 é selecionado a partir de Y e S; no qual, X2 é selecionado a partir de Y e S; no qual, X3 é selecionado a partir de Y e S; no qual, X4 é selecionado a partir de Y e S; no qual, X5 é selecionado a partir de Y e S;

(ii) CDRH2 compreende uma seqüência de aminoácidos: X1-I-X2-P-X3-X4-G-X5-T-X6-Y-A-D-S-V-K-G, caracterizado pelo fato de que X1 é a posição 50 de acordo com o sistema de numeração de Kabat ; no qual, X1 é selecionado a partir de Y e S; no qual, X2 é selecionado a partir de Y e S; no qual, X3 é selecionado a partir de Y e S; no qual, X4 é selecionado a partir de Y e S; no qual, X5 é selecionado a partir de Y e S; e no qual, X6 selecionado a partir de Y e S; e

(iii) CDRH3 compreende uma seqüência de aminoácidos: X1-X2-X3-X4-X5-X6-X7-X8-X9-X10-X11-X12-X13-X14-X15-X16-X17-X18-X19, caracterizado pelo fato de que X1 é a posição 95 de acordo com o sistema de numeração de Kabat, e no qual os aminoácidos em cada uma das posições de X1-X17 são selecionadas a partir de A, C, F, G, I, L, N, P, R, T, W ou Y, ou não estão presentes; X18 é selecionado a partir de G e A; e X19 é selecionado a partir de F, L, I, e M.

Em um aspecto da invenção, a CDRH1 compreende pelo menos de uma seqüência de aminoácidos selecionada de qualquer uma das SEQs ID

Nos: 816-842 ou uma das seqüências CDRH1 na Figura 21A. A CDRH2 compreende de pelo menos uma seqüência de aminoácido selecionada de qualquer uma das SEQs ID Nos: 843-869 ou uma das seqüências CDRH2 na Figura 21A. A CDRH3 compreende pelo menos de uma seqüência de aminoácidos selecionada de qualquer uma das SEQs ID Nos: 870-896 ou uma das seqüências CDRH3 na Figura 21A.

Em outro exemplo de realização, um polipeptídeo contendo um domínio variável de cadeia pesada de imunoglobulina, no qual:

(i) CDRH1 compreende uma seqüência de aminoácidos: G-F-X1-I-X2-X3-X4-X5-I-H, caracterizado pelo fato de que G é a posição 26 e X1 é a posição 28 de acordo com o sistema de numeração de Kabat; e no qual os aminoácidos em cada uma das posições de X1-X5 são selecionadas a partir de S e um dentre Y, W, R ou F; e

(ii) CDRH2 compreende uma seqüência de aminoácidos: X1-I-X2-P-X3-X4-G-X5-T-X6-Y-A-D-S-V-K-G, caracterizado pelo fato de que X1 é a posição 50 de acordo com o sistema de numeração de Kabat ; e no qual os aminoácidos em cada uma das posições de X1-X6 são selecionadas a partir de S e um dentre Y, W, R ou F; e

(iii) CDRH3 compreende uma seqüência de aminoácidos: X1-X2-X3-X4-X5-X6-X7-X8-X9-X10-X11-X12-X13-X14-X15-X16-X17-X18-X19, caracterizado pelo fato de que X1 é a posição 95 de acordo com o sistema de numeração de Kabat, e os aminoácidos em cada uma das posições de X1-X19 são selecionadas a partir S e um dentre Y, W, R ou F, ou não esta presente; X18 é selecionado a partir de G e A; e X19 é selecionado a partir de F, L, I, e M.

Em um aspecto da invenção, a CDRH1 compreende pelo menos de uma seqüência de aminoácidos selecionada de qualquer uma das SEQs ID Nos: 924-950 ou uma das seqüências CDRH1 na Figura 24A. A CDRH2 compreende de pelo menos uma seqüência de aminoácido selecionada de

qualquer uma das SEQs ID Nos: 951-977 ou uma das seqüências CDRH2 na Figura 24A. A CDRH3 compreende pelo menos de uma seqüência de aminoácidos selecionada de qualquer uma das SEQs ID Nos: 978-1004 ou uma das seqüências CDRH3 na Figura 24A.

Em um aspecto da invenção, o polipeptídeo se liga ao HER-2 humano. Em um aspecto adicional da invenção, o polipeptídeo compreende um anticorpo. Em um aspecto da invenção, o anticorpo compreende um domínio variável da cadeia pesada que compreende;

i) um CDRH1 contendo uma seqüência de aminoácidos GFSIYSSYIH (SEQ ID No: 821);

ii) um CDRH2 contendo uma seqüência de aminoácidos SIYPYSGYTSYADSVKG (SEQ ID No: 848); e

iii) um CDRH3 contendo uma seqüência de aminoácidos WWSSAFDY (SEQ ID No: 875). Em outro aspecto da invenção, o anticorpo compreende um domínio variável da cadeia pesada que compreende;

i) um CDRH1 contendo uma seqüência de aminoácidos GFSIWWSWIH (SEQ ID NO: 932);

ii) um CDRH2 contendo uma seqüência de aminoácidos SISPSSGWTSYADSVKG (SEQ ID No: 959); e

iii) um CDRH3 contendo uma seqüência de aminoácidos WWSSAMDY (SEQ ID No: 986). Em outro aspecto da invenção, o anticorpo compreende um domínio variável da cadeia pesada que compreende;

i) um CDRH1 contendo uma seqüência de aminoácidos GFSISSSYIH (SEQ ID No: 944);

ii) um CDRH2 contendo uma seqüência de aminoácidos SIYPYSGYTSYADSVKG (SEQ ID No: 971); e

iii) um CDRH3 contendo uma seqüência de aminoácidos YYSYALDY (SEQ ID No: 998). Em outro aspecto da invenção, o anticorpo

compreende um domínio variável da cadeia pesada que compreende;

i) um CDRH1 contendo uma seqüência de aminoácidos GFYISSSSIH (SEQ ID No: 230);

ii) um CDRH2 contendo uma seqüência de aminoácidos YIYPSSGYTSYADSVKG (SEQ ID No: 336); e

iii) um CDRH3 contendo uma seqüência de aminoácidos GYYYSYYSGYALDY (SEQ ID No: 442).

Em outro aspecto da invenção, o anticorpo compreende adicionalmente de um domínio variável da cadeia leve, no qual o CDRL3 compreende uma seqüência de aminoácidos Q-Q-X1-X2-X3-X4-P-X5-T (ID SEQ NO: 25); caracterizado pelo fado de que X1 é a posição 91 de acordo com o sistema de numeração de Kabat e é selecionado a partir de S e Y; X2 é selecionado a partir de S, Y e F; X3 é selecionado a partir de Y, S e F; X4 é selecionado a partir de Y e S, e X5 é selecionado a partir de S e Y.

Em outro aspecto da invenção, é fornecido um anticorpo que compreende um domínio variável da cadeia leve possuindo uma seqüência CDRL3 que possuí a seqüência de aminoácidos Q-Q-X1-X2-X3-X4-P-X5-T (SEQ ID No: ___), na qual X1 é a posição 91 de acordo com a numeração de Kabat e é selecionado a partir de Y e S; X2 é selecionado a partir de Y e S; X3 é selecionado a partir de Y e S; X4 é selecionado a partir de Y e S; X5 é selecionado a partir de S e Y. Em outro aspecto da invenção, é fornecido um anticorpo que compreende um domínio variável da cadeia leve possuindo uma seqüência CDRL3 que possuí a seqüência de aminoácidos Q-Q-X1-X2-X3-X4-P-X5-T, na qual X1 é a posição 91 de acordo com a numeração de Kabat e os aminoácidos em cada uma das posições de X1-X5 são selecionadas a partir S e um dentre W, R ou F. Em um aspecto da invenção, a CDRL3 compreende pelo menos de uma seqüência de aminoácidos selecionada de qualquer uma das SEQs ID Nos: 83-188, 507-523, 789-815 e 879-923 ou uma das

seqüências CDRL3 na Figura 11, 15, 21 ou 24.

Em outro aspecto da invenção, é fornecido um polipeptídeo que compreende um domínio variável da cadeia leve de imunoglobulina, no qual:

(i) CDRL1 compreende uma primeira seqüência consenso hipervariável ou variante desta contendo uma substituição em uma ou mais posições, em comparação com a seqüência consenso hipervariável correspondente;

(ii) CDRL2 compreende uma segunda seqüência consenso hipervariável ou variante desta contendo uma substituição em uma ou mais posições, em comparação com a seqüência consenso hipervariável correspondente, e

(iv) CDRL3 compreende uma seqüência de aminoácidos: Q-Q-X1-X2-X3-$(X4)_n$-X5-X6-T (SEQ ID No.: ___), no qual X1-X6 são aminoácidos naturalmente presentes que não a cisteína e X1 é a posição 91 de acordo com o sistema de numeração de Kabat.

Em um aspecto, X1 é a posição 91 de acordo com o sistema de numeração de Kabat e X1 é selecionado a partir de Y e S; X2 é selecionado a partir de Y e S; X3 é selecionado a partir de Y e S; X4 é selecionado a partir de Y e S; X5 é selecionado a partir de P e L; e X6 é selecionado a partir de F, L, I e V. Em um aspecto, n tem um valor de 1 a 3. Em um aspecto da invenção, a CDRL3 compreende pelo menos de uma seqüência de aminoácidos selecionada de qualquer uma das SEQs ID Nos: 83-188, 507-523, 789-815 e 879-923 ou uma das seqüências CDRL3 na Figura 11, 15, 21 ou 24. Em um aspecto, a primeira seqüência consenso hipervariável é R-A-S-Q-D-V-N-T-A-V-A (SEQ ID No: 29). Em um aspecto, a segunda seqüência consenso hipervariável é S-A-S-S-L-Y-S (SEQ ID No: 30).

Em outro exemplo de realização, é fornecido um polipeptídeo que

compreende um domínio variável da cadeia leve de imunoglobulina, no qual:

(i) CDRL1 compreende uma primeira seqüência consenso hipervariável ou variante desta contendo uma substituição em uma ou mais posições, em comparação com a seqüência consenso hipervariável correspondente;

(ii) CDRL2 compreende uma segunda seqüência consenso hipervariável ou variante desta contendo uma substituição em uma ou mais posições, em comparação com a seqüência consenso hipervariável correspondente, e

(iii) CDRL3 compreende uma seqüência de aminoácidos: Q-Q-X1-X2-X3-X4-P-X5-T (SEQ ID No.: ___), no qual X1-X5 são aminoácidos naturalmente presentes que não a cisteína e X1 é a posição 91 de acordo com o sistema de numeração de Kabat.

Em um aspecto, X1 é a posição 91 de acordo com o sistema de numeração de Kabat e X1 é selecionado a partir de Y e S; X2 é selecionado a partir de Y e S; X3 é selecionado a partir de Y e S; X4 é selecionado a partir de Y e S; X5 é selecionado a partir de Y e S. Em outro aspecto da invenção, X1 é a posição 91 de acordo com a numeração de Kabat e os aminoácidos em cada uma das posições de X1-X5 são selecionadas a partir S e um dentre Y, W, R e F. Em um aspecto da invenção, a CDRL3 compreende pelo menos de uma seqüência de aminoácidos selecionada de qualquer uma das SEQs ID Nos: 83-188, 507-523, 789-815 e 879-923 ou uma das seqüências CDRL3 na Figura 11, 15, 21 ou 24. Em um aspecto, a primeira seqüência consenso hipervariável é R-A-S-Q-D-V-N-T-A-V-A (SEQ ID No: 29). Em um aspecto, a segunda seqüência consenso hipervariável é S-A-S-S-L-Y-S (SEQ ID No: 30).

Em um exemplo de realização específico, um polipeptídeo compreende de pelo menos dois domínios variáveis de anticorpo compreendendo: no fornecimento de (a) um domínio variável de cadeia pesada

de anticorpo compreendendo qualquer polipeptídeo de cadeia pesada citado acima, e (b) um domínio variável de cadeia leve de anticorpo compreendendo qualquer polipeptídeo de cadeia leve citado acima.

Em certos exemplos de realização, são fornecidos anticorpos que incluem um polipeptídeo composto por um domínio variável de cadeia pesada de imunoglobulina de acordo com qualquer um dos polipeptídeos de cadeia pesada citados acima, e um polipeptídeo composto por um domínio variável de cadeia leve de imunoglobulina de acordo com qualquer um dos polipeptídeos de cadeia leve citados acima.

Em certos aspectos, os polipeptídeos e anticorpos citados acima incluem ainda um domínio de dimerização ligado à extremidade C-terminal de um domínio variável de cadeia pesada de anticorpo. Em alguns desses aspectos, o domínio de dimerização compreende um domínio de zíper de leucina ou uma seqüência que incluí pelo menos um resíduo cisteína. Em alguns desses aspectos, o domínio de dimerização incluí uma região de dobradiça de um anticorpo e um zíper de leucina. Em outros aspectos, o domínio de dimerização é uma única cisteína.

Em um exemplo de realização, é fornecido um polipeptídeo de fusão compreendendo qualquer polipeptídeo citado acima, no qual, um domínio variável de anticorpo compreendendo o polipeptídeo citado acima é fundido a pelo menos uma porção de uma proteína da cápside viral. Em um aspecto, a proteína da cápside viral é selecionada a partir do grupo composto pelas proteínas pIII, proteína principal da cápside pVIII, Soc, Hoc, gpD, pv1, e variantes destes. Em um aspecto, o polipeptídeo de fusão ainda inclui um domínio de dimerização entre o domínio variável e as proteínas da cápside viral. Em tal aspecto, o domínio variável é um domínio variável de cadeia pesada. Em outro aspecto, o polipeptídeo de fusão inclui ainda um domínio variável fundido a um peptídeo marcador. Em tal aspecto, o domínio variável é

um domínio variável de cadeia leve. Em outro aspecto, o peptídeo marcado é selecionado a partir do grupo, constituído por gD, *c-myc*, poli-his, proteína fluorescente e β-galactosidase.

Em um exemplo de realização, um ou mais do polipeptídeos descritos acima possuem adicionalmente de regiões de suporte FR1, FR2, FR3, e/ou FR4 para um polipeptídeo do domínio variável correspondente à variante de CDRH1, CDRH2, CDRH3, e/ou CDRL3, onde as regiões de suporte são obtidas a partir de um único polipeptídeo modelo. Em tais exemplos, cada uma das regiões de suporte compreende uma seqüência de aminoácidos correspondente a região de suporte das seqüências de aminoácidos do anticorpo 4D5 (SEQ ID No: 6 – 9 e 10-13) ou variante do anticorpo 4D5 (SEQ ID No: 14-17e 18-21).

Em um exemplo de realização, é fornecida uma biblioteca que consta de uma variedade de um ou mais polipeptídeos descritos acima, na qual a biblioteca tem pelo menos 1 x 10^4 seqüências de domínios variáveis de anticorpos.

Em outro exemplo de realização, um método para gerar uma composição, que incluí uma variedade de polipeptídeos compreendendo em:

(a) produzir uma variedade de polipeptídeos que inclui:

(i) CDRH1 compreende uma seqüência de aminoácidos: G-F-X1-I-X2-X3-X4-X5-I-H (SEQ ID No.: __), caracterizado pelo fato de que G é posição 26 e X1 é posição 28 de acordo com o sistema de numeração de Kabat; no qual o aminoácido X1 é selecionado de Y e S; X2 é selecionado de Y e S; X3 é selecionado de Y e S; X4 é selecionado de Y e S; e X5 é selecionado de Y e S;

(ii) CDRH2 compreende uma seqüência de aminoácidos: X1-I-X2-P-X3-X4-G-X5-T-X6-Y-A-D-S-V-K-G (SEQ ID No.: __) no qual, X1 é posição 50 de acordo com o sistema de numeração de Kabat ; no qual o aminoácido X1 é selecionado de Y e S; X2 é selecionado de Y e S; X3 é selecionado de Y e S;

X4 é selecionado de Y e S; X5 é selecionado de Y e S; e X6 é selecionado de Y e S, e ;

(iii) CDRH3 compreende uma seqüência de aminoácidos: X1-X2-X3-X4-X5-X6-X7-X8-X9-X10-X11-X12-X13-X14-X15-X16-X17-X18-X19-D-Y (SEQ ID No.:__), no qual, X1 é posição 95 de acordo com o sistema de numeração de Kabat, no qual os aminoácidos em cada uma das posições de X1-X6 são selecionados a partir de um *pool* de aminoácidos numa razão molar de 50% de Y, 25% de S e 25% de G, e no qual os aminoácidos em cada uma das posições de X7-X17 são selecionados a partir de um *pool* de aminoácidos numa razão molar de 50% de Y, 25% de S e 25% de G, ou não estão presentes, no qual, X18 é selecionado de G e A e X19 é selecionado de F, L, I, e M.

Em um aspecto da invenção, o método compreende adicionalmente:

(b) produzir uma variedade de polipeptídeos que inclui:

(i) CDRL1 compreendendo uma primeira seqüência consenso hipervariável ou variante desta contendo a substituição em uma ou mais posições comparada a seqüência consenso hipervariável correspondente;

(ii) CDRL2 compreendendo uma segunda seqüência consenso hipervariável ou variante desta contendo a substituição em uma ou mais posições comparada a seqüência consenso hipervariável correspondente, e;

(iii) CDRL3 compreendendo uma seqüência de aminoácido: Q-Q-X1-X2-X3-X4-X5-T, no qual X1 é posição 91 de acordo com o sistema de numeração de Kabat; no qual X1 é selecionado de Y e S; no qual X2 é selecionado de Y e S; no qual X3 é selecionado de Y e S; no qual X4 é selecionado de Y e S; no qual X5 é selecionado de Y e S.

Em um aspecto da invenção, a variedade de polipeptídeos é codificada por uma variedade de polinucleotídeos.

Em outro exemplo de realização, o método para produzir uma

composição compreende no fornecimento de uma variedade de polipeptídeos, compreendendo:

(a) em produzir uma variedade de polipeptídeos que inclui:

(i) CDRH1 que compreende uma seqüência de aminoácidos: G-F-X1-I-X2-X3-X4-X5-I-H (SEQ ID No.: ___), caracterizado pelo fato de que G é posição 28 de acordo com o sistema de numeração de Kabat; no qual o aminoácido X1 é selecionado de Y e S; X2 é selecionado de Y e S; X3 é selecionado de Y e S; X4 é selecionado de Y e S; e X5 é selecionado de Y e S,e ;

(ii) CDRH2 compreende uma seqüência de aminoácidos: X1-I-X2-P-X3-X4-G-X5-T-X6-Y-A-D-S-V-K-G (SEQ ID No.: ___), caracterizado pelo fato de que X1 é posição 50 de acordo com o sistema de numeração de Kabat ; no qual o aminoácido X1 é selecionado de Y e S; X2 é selecionado de Y e S; X3 é selecionado de Y e S; X4 é selecionado de Y e S; X5 é selecionado de Y e S; e X6 é selecionado de Y e S, e;

(iii) CDRH3 compreende uma seqüência de aminoácidos: X1-X2-X3-X4-X5-X6-X7-X8-X9-X10-X11-X12-X13-X14-X15-X16-X17-X18-X19-D-Y (SEQ ID No.: ___), caracterizado pelo fato de que X1 é posição 95 de acordo com o sistema de numeração de Kabat, no qual os aminoácidos em cada uma das posições de X1-X6 são selecionados de um *pool* de aminoácidos em uma relação molar de 25% de Y, 50% de S e 25% de R, e no qual os aminoácidos em cada uma das posições de X7-X17 são selecionados a partir de um *pool* de aminoácidos numa razão molar de 25% de Y, 50% de S e 25% de R, no qual, X18 é selecionado de G e A e X19 é selecionado de I, M, L e F.

Em um aspecto da invenção, o método compreende adicionalmente:

(b) produzir uma variedade de polipeptídeos que inclui:

(i) CDRL1 compreendendo uma primeira seqüência consenso hipervariável ou variante desta contendo a substituição em uma ou mais

posições comparada a seqüência consenso hipervariável correspondente;

(ii) CDRL2 compreendendo uma segunda seqüência consenso hipervariável ou variante desta contendo a substituição em uma ou mais posições comparada a seqüência consenso hipervariável correspondente, e;

(iii) CDRL3compreende a seqüência de aminoácidos Q-Q-X1-X2-X3-X4-P-X5-T (SEQ ID No.:___), no qual X1 é posição 91 de acordo com a numeração de Kabat e é selecionado de S e Y; no qual, X2 é selecionado de S e Y; no qual, X3 é selecionado de Y e S; no qual, X4 é selecionado de Y e S; no qual, X5 é selecionado de Y e S.

Em um aspecto da invenção, a variedade de polipeptídeos é codificada por uma variedade de polinucleotídeos.

Em outro exemplo de realização, o método para produzir uma composição compreende no fornecimento de uma variedade de polipeptídeos, compreendendo:

(a) em produzir uma variedade de polipeptídeos que inclui:

(i) CDRH1 que compreende uma seqüência de aminoácidos: G-F-X1-I-X2-X3-X4-X5-I-H (SEQ ID No.: ___), caracterizado pelo fato de que G é posição 26 e X1 é posição 28 de acordo com o sistema de numeração de Kabat; no qual o aminoácido X1 é selecionado de Y e S; X2 é selecionado de Y e S; X3 é selecionado de Y e S; X4 é selecionado de Y e S; e X5 é selecionado de Y e S,e ;

(ii) CDRH2 compreende uma seqüência de aminoácidos: X1-I-X2-P-X3-X4-G-X5-T-X6-Y-A-D-S-V-K-G (SEQ ID No.: ___), caracterizado pelo fato de que X1 é posição 50 de acordo com o sistema de numeração de Kabat ; no qual o aminoácido X1 é selecionado de Y e S; X2 é selecionado de Y e S; X3 é selecionado de Y e S; X4 é selecionado de Y e S; X5 é selecionado de Y e S; e X6 é selecionado de Y e S, e;

(iii) CDRH3 compreende uma seqüência de aminoácidos: X1-X2-

X3-X4-X5-X6-X7-X8-X9-X10-X11-X12-X13-X14-X15-X16-X17-X18-X19-D-Y (SEQ ID No.:___), no qual, X1 é a posição 95 de acordo com o sistema de numeração de Kabat, caracterizada pelo fato dos aminoácidos em cada uma das posições de X1-X6 serem selecionados a partir de um *pool* de aminoácidos numa razão molar de 38% de Y, 25% de S, e 25% de G e 12% de R; caracterizada pelo fato dos aminoácidos em cada uma das posições de X7-X17 serem selecionados a partir de um pool de aminoácidos numa razão molar de 38% de Y, 25% de S, e 25% de G e 12% de R, ou não estarem presentes; no qual, X18 é selecionado a partir de G e A, e no qual, X19 é selecionado a partir de I, M, L e F.

Em um aspecto da invenção, o método compreende adicionalmente:

(b) produzir uma variedade de polipeptídeos que inclui:

(i) CDRL1 compreendendo uma primeira seqüência consenso hipervariável ou variante desta contendo a substituição em uma ou mais posições comparada a seqüência consenso hipervariável correspondente;

(ii) CDRL2 compreendendo uma segunda seqüência consenso hipervariável ou variante desta contendo a substituição em uma ou mais posições comparada a seqüência consenso hipervariável correspondente, e;

(iii) CDRL3compreende a seqüência de aminoácidos Q-Q-X1-X2-X3-X4-P-X5-T (SEQ ID No.:___), no qual X1 é posição 91 de acordo com a numeração de Kabat e é selecionado de Y e S; no qual, X2 é selecionado de Y e S; no qual, X3 é selecionado de Y e S; no qual, X4 é selecionado de Y e S; no qual, X5 é selecionado de Y e S.

Em um aspecto da invenção, a variedade de polipeptídeos é codificada por uma variedade de polinucleotídeos.

Em outro exemplo de realização, o método para produzir uma composição compreende no fornecimento de uma variedade de polipeptídeos,

compreendendo:

(a) em produzir uma variedade de polipeptídeos que inclui:

(i) CDRH1 que compreende uma seqüência de aminoácidos: G-F-X1-I-X2-X3-X4-X5-I-H (SEQ ID No.: ___), caracterizado pelo fato de que G é posição 26 e X1 é posição 28 de acordo com o sistema de numeração de Kabat; no qual o aminoácido X1 é selecionado de Y e S; X2 é selecionado de Y e S; X3 é selecionado de Y e S; X4 é selecionado de Y e S; e X5 é selecionado de Y e S,e ;

(ii) CDRH2 compreende uma seqüência de aminoácidos: X1-I-X2-P-X3-X4-G-X5-T-X6-Y-A-D-S-V-K-G (SEQ ID No.: ___), caracterizado pelo fato de que X1 é posição 50 de acordo com o sistema de numeração de Kabat ; no qual o aminoácido X1 é selecionado de Y e S; X2 é selecionado de Y e S; X3 é selecionado de Y e S; X4 é selecionado de Y e S; X5 é selecionado de Y e S; e X6 é selecionado de Y e S, e;

(iii) CDRH3 compreende uma seqüência de aminoácidos: X1-X2-X3-X4-X5-X6-X7-X8-X9-X10-X11-X12-X13-X14-X15-X16-X17-X18-X19-D-Y (SEQ ID No: ___), no qual, X1 é a posição 95 de acordo com o sistema de numeração de Kabat, caracterizada pelo fato dos aminoácidos em cada uma das posições de X1-X6 serem selecionados a partir de um pool de aminoácidos numa razão molar de 20% de Y, 26% de S, 26% de G, 13% de R, 1% de A, 1% de D, 1% de E, 1% de F, 1% de H, 1% de I, 1% de K, 1% de L, 1% de M, 1% de N, 1% de P, 1% de Q, 1% de T, 1% de V e 1% de W; caracterizada pelo fato dos aminoácidos em cada uma das posições de X7-X17 serem selecionados a partir de um pool de aminoácidos numa razão molar de 20% de Y, 26% de S, 26% de G, 13% de R, 1% de A, 1% de D, 1% de E, 1% de F, 1% de H, 1% de I, 1% de K, 1% de L, 1% de M, 1% de N, 1% de P, 1% de Q, 1% de T, 1% de V e 1% de W, ou não estão presentes; no qual, X18 é selecionado a partir de G e A, e no qual, X19 é selecionado a partir de I, M, L e F.

Em um aspecto da invenção, o método compreende adicionalmente:

(b) na produção de uma variedade de polipeptídeos que inclui:

(i) CDRL1 compreendendo uma primeira seqüência consenso hipervariável ou variante desta contendo a substituição em uma ou mais posições comparada a seqüência consenso hipervariável correspondente;

(ii) CDRL2 compreendendo uma segunda seqüência consenso hipervariável ou variante desta contendo a substituição em uma ou mais posições comparada a seqüência consenso hipervariável correspondente, e;

(iii) CDRL3compreende a seqüência de aminoácidos Q-Q-X1-X2-X3-X4-P-X5-T (SEQ ID No.:___), no qual X1 é posição 91 de acordo com a numeração de Kabat e é selecionado de Y e S; no qual, X2 é selecionado de Y e S; no qual, X3 é selecionado de Y e S; no qual, X4 é selecionado de Y e S; no qual, X5 é selecionado de Y e S.

Em um aspecto, a primeira seqüência consenso hipervariável compreende uma seqüência de consenso CDRL1 de Kabat. Em um aspecto a primeira seqüência consenso é R-A-S-Q-D-V-N-T-A-V-A (SEQ ID No: 29). Em um aspecto, a segunda seqüência consenso hipervariável compreende uma seqüência de consenso CDRL2 de Kabat. Em um aspecto, a segunda seqüência consenso hipervariável é S-A-S-S-L-Y-S (SEQ ID No: 30). Em um aspecto da invenção, a variedade de polipeptídeos é codificada por uma variedade de polinucleotídeos.

Em um exemplo de realização, o método para produzir uma composição compreende no fornecimento de uma variedade de polipeptídeos, compreendendo:

(a) em produzir uma variedade de polipeptídeos que inclui:

(i) CDRH1 compreende uma seqüência de aminoácidos: G-F-X1-I-X2-X3-X4-X5-I-H (SEQ ID No: 22), no qual, X1 é a posição 28 de acordo com

o sistema de numeração de Kabat e é selecionado de S e Y; X2 é selecionado a partir de S e Y; X3 é selecionado a partir de S e Y; X4 é selecionado de S e Y; X5 é selecionado de S e Y;

(ii) CDRH2 compreende uma seqüência de aminoácidos: X1-I-X2-P-X3-X4-G-X5-T-X6-Y-A-D-S-V-K-G (SEQ ID No: 23), no qual, X1 é a posição 50, de acordo com o sistema de numeração de Kabat e é selecionado a partir de S e Y; X2 é selecionado de S e Y; X3 é selecionado de S e Y; X4 é selecionado de S e Y; X5 é selecionado de S e Y e X6 é selecionado de S e Y, e;

(iii) CDRH3 compreende uma seqüência de aminoácidos: X1-X2-X3-X4-X5-x6-X7-X8-X9-X10-X11-X12-X13-X14-X15-X16-X17-X18-X19-D-Y (SEQ ID No: 24), no qual, X1 é a posição 95 de acordo com o sistema de numeração de Kabat, e no qual X1 é selecionado de Y, S, G e R; X2 é selecionado de Y, S, G, R e M; X3 é selecionado de G, Y, S, R e W; X4 é selecionado de Y, S, G, R e F; X5 é selecionado de G, Y, N e A; X6 é selecionado de F, M, L, A, R, G, H, W, V, Y e S; X7 é selecionado de M. L, G, A, R, F e Y, X8 é selecionado de M, L, F, I, R, G, P, V, Y e S; X9 é selecionado de G, Y e R; X10 é selecionado de M, F, G, Y, R e S; X11 é selecionado de A, G, Y, R e S; X12 é selecionado de I, M, L, F, A, G, R, T, Y e S; X13 é selecionado de F, M, L, G, A, T, Y e S; X14 é selecionado de L, F, M, I,G, A, T e Y; X15 é selecionado de M,Y G, L e R ou não está presente; X16 é selecionado de Y e G, ou não está presente; X17 é selecionado de R, M e G, ou não está presente; X18 é selecionado de P e A, ou não está presente; e X19 é A, ou não está presente.

Em um aspecto da invenção, a CDRH1 compreende pelo menos de uma seqüência de aminoácidos selecionada de qualquer uma das SEQs ID Nos: 189-294. Em um aspecto da invenção, a CDRH2 compreende pelo menos de uma seqüência de aminoácidos selecionada de qualquer uma das SEQs ID Nos: 295-400. Em um aspecto da invenção, a CDRH3 compreende pelo menos

de uma seqüência de aminoácidos selecionada de qualquer uma das SEQs ID Nos: 401-506.

Em um aspecto da invenção, o método compreende adicionalmente:

(b) na produção de uma variedade de polipeptídeos que inclui:

(i) CDRL1 compreendendo uma primeira seqüência consenso hipervariável ou variante desta contendo a substituição em uma ou mais posições comparada a seqüência consenso hipervariável correspondente;

(ii) CDRL2 compreendendo uma segunda seqüência consenso hipervariável ou variante desta contendo a substituição em uma ou mais posições comparada a seqüência consenso hipervariável correspondente, e;

(iii) CDRL3 compreendendo uma seqüência de aminoácidos Q-Q-X1-X2-X3-X4-P-X5-T (ID SEQ NO: 25); caracterizado pelo fado de que X1 é a posição 91 de acordo com o sistema de numeração de Kabat e é selecionado a partir de S e Y; X2 é selecionado a partir de S, Y e F; X3 é selecionado a partir de Y, S e F; X4 é selecionado a partir de Y e S, e X5 é selecionado a partir de S e Y.

Em um aspecto da invenção, a variedade de polipeptídeos é codificada por uma variedade de polinucleotídeos.

Em um exemplo de realização, é fornecido um método para produzir uma composição compreendendo uma variedade de polipeptídeos, compreendendo:

(a) em produzir uma variedade de polipeptídeos que inclui:

(i) CDRH1 que compreende uma seqüência de aminoácidos: G-F-X1-I-X2-X3-X4-X5-I-H (SEQ ID No.: ___), caracterizado pelo fato de que G é posição 26 e X1 é posição 28 de acordo com o sistema de numeração de Kabat; no qual o aminoácido X1 é selecionado de Y e S; X2 é selecionado de Y e S; X3 é selecionado de Y e S; X4 é selecionado de Y e S; e X5 é selecionado de Y e S,e ;

(ii) CDRH2 compreende uma seqüência de aminoácidos: X1-I-X2-P-X3-X4-G-X5-T-X6-Y-A-D-S-V-K-G (SEQ ID No.: ___), caracterizado pelo fato de que X1 é posição 50 de acordo com o sistema de numeração de Kabat ; no qual o aminoácido X1 é selecionado de Y e S; X2 é selecionado de Y e S; X3 é selecionado de Y e S; X4 é selecionado de Y e S; X5 é selecionado de Y e S; e X6 é selecionado de Y e S, e;

(iii) CDRH3 compreende uma seqüência de aminoácidos: X1-X2-X3-X4-X5-X6-X7-X8-X9-X10-X11-X12-X13-X14-X15-X16-X17-X18-X19 (SEQ ID No.: ___), caracterizado pelo fato de que X1 é a posição 95 de acordo com o sistema de numeração de Kabat, e no qual os aminoácidos em cada uma das posições de X1-X17 são selecionadas a partir de A, C, F, G, I, L, N, P, R, T, W ou Y, ou não estão presentes; X18 é selecionado a partir de G e A; e X19 é selecionado a partir de F, L, I, e M.

Em um aspecto da invenção, o método compreende adicionalmente:

(b) a produção de uma variedade de polipeptídeos que inclui:

(i) CDRL1 compreendendo uma primeira seqüência consenso hipervariável ou variante desta contendo a substituição em uma ou mais posições comparada a seqüência consenso hipervariável correspondente;

(ii) CDRL2 compreendendo uma segunda seqüência consenso hipervariável ou variante desta contendo a substituição em uma ou mais posições comparada a seqüência consenso hipervariável correspondente, e;

(iii) CDRL3 compreendendo uma seqüência de aminoácidos Q-Q-X1-X2-X3-X4-P-X5-T (ID SEQ NO: ___); caracterizado pelo fado de que X1 é a posição 91 de acordo com o sistema de numeração de Kabat e é selecionado a partir de Y e S; X2 é selecionado a partir de Y e S; X3 é selecionado a partir de Y, S e F; X4 é selecionado a partir de Y e S, e X5 é selecionado a partir de Y e S.

Em um exemplo de realização, é fornecido um método para

produzir uma composição compreendendo uma variedade de polipeptídeos, compreendendo:

(a) em produzir uma variedade de polipeptídeos que inclui:

(i) CDRH1 que compreende uma seqüência de aminoácidos: G-F-X1-I-X2-X3-X4-X5-I-H (SEQ ID No.: ___), caracterizado pelo fato de que G é posição 26 e X1 é posição 28 de acordo com o sistema de numeração de Kabat; e no qual os aminoácidos em cada uma das posições de X1-X5 são selecionadas a partir de S e um dentre Y, W, R ou F; e

(ii) CDRH2 compreende uma seqüência de aminoácidos: X1-I-X2-P-X3-X4-G-X5-T-X6-Y-A-D-S-V-K-G (SEQ ID No.: ___), caracterizado pelo fato de que X1 é a posição 50 de acordo com o sistema de numeração de Kabat ; e no qual os aminoácidos em cada uma das posições de X1-X6 são selecionadas a partir de S e um dentre Y, W, R ou F; e

(iii) CDRH3 compreende uma seqüência de aminoácidos: X1-X2-X3-X4-X5-X6-X7-X8-X9-X10-X11-X12-X13-X14-X15-X16-X17-X18-X19 (SEQ ID No.: ___), caracterizado pelo fato de que X1 é a posição 95 de acordo com o sistema de numeração de Kabat, e os aminoácidos em cada uma das posições de X1-X17 são selecionadas a partir S e um dentre Y, W, R ou F, ou não esta presente; X18 é selecionado a partir de G e A; e X19 é selecionado a partir de F, L, I, e M.

Em um aspecto da invenção, o método compreende adicionalmente:

(b) a produção de uma variedade de polipeptídeos que inclui:

(i) CDRL1 compreendendo uma primeira seqüência consenso hipervariável ou variante desta contendo a substituição em uma ou mais posições comparada a seqüência consenso hipervariável correspondente;

(ii) CDRL2 compreendendo uma segunda seqüência consenso hipervariável ou variante desta contendo a substituição em uma ou mais

posições comparada a seqüência consenso hipervariável correspondente, e;

(iii) CDRL3 compreendendo uma seqüência de aminoácidos Q-Q-X1-X2-X3-X4-P-X5-T (ID SEQ NO: ___); caracterizado pelo fado de que X1 é a posição 91 de acordo com o sistema de numeração de Kabat e os aminoácidos em cada uma das posições de X1-X5 são selecionadas a partir S e um dentre Y, W, R ou F.

Em um exemplo de realização, é fornecido um método para produzir um ou mais seqüências CDRH1, CDRH2, CDRH3, CDRL1, CDRL2, e CDRL3 de anticorpos descritos acima, constando da:

(a) construção de um vetor de expressão contendo uma seqüência polinucleotídica que codifica uma cadeia leve, uma cadeia pesada ou ambos os domínios variáveis das cadeias leves e pesadas de um anticorpo fonte incluindo pelo menos um, dois , três, quatro, cinco ou todos os CDRs selecionados do grupo constituído por CDRL1, CDRL2, CDRL3, CDRH1, CDRH2 e CDRH3; e

(b) mutando, pelo menos, um, dois, três, quatro, cinco ou todos os CDRs do anticorpo para gerar uma ou mais das regiões hipervariáveis descritas acima.

Em um exemplo de realização, um método para selecionar um polipeptídeo que se liga a um antígeno alvo é fornecido, compreendendo em:

(a) gerar uma composição com uma variedade de um ou mais polipeptídeos descritos acima;

(b) selecionar um ou mais polipeptídeos da composição que se liga ao antígeno alvo;

(c) isolar um ou mais polipeptídeos que se liga ao antígeno alvo dos polipeptídeos que não se ligam ao antígeno alvo; e

(d) identificar um ou mais polipeptídeos que ligam ao antígeno alvo com uma afinidade de ligação ao antígeno alvo desejada.

Em um exemplo de realização, é fornecido um método para selecionar um domínio variável que se liga a antígenos alvos de uma biblioteca de anticorpos, compreendendo em:

(a) interagir uma ou mais das bibliotecas acima descritas com um antígeno alvo;

(b) separar um ou mais polipeptídeos que ligam especificamente ao antígeno alvo dos polipeptídeos que não se ligam especificamente ao antígeno alvo, recuperando um ou mais polipeptídeos que se ligam especificamente ao antígeno alvo e incubando um ou mais polipeptídeos que se ligam especificamente ao antígeno alvo em uma série de soluções que consiste em diminuir a quantidade de antígeno alvo a uma concentração de cerca de 0,1 nM a cerca de 1000 nM, e

(c) Seleção de um ou mais polipeptídeos que se ligam especificamente ao antígeno alvo e que podem ligar-se a uma baixa concentração de antígeno alvo ou que possuem uma afinidade de cerca de 0,1 nM a 200 nM.

Em um aspecto, o antígeno alvo é HER2 ou DR5. Em um aspecto, a concentração do antígeno alvo é cerca de 100 a 250 nM. Em um aspecto, a concentração do antígeno alvo é cerca de 25 nM a 100 nM. Em alguns exemplos de realização, um ou mais bibliotecas, clones ou polipeptídeos são selecionados contra um painel de antígenos que incluí o antígeno alvo. Em alguns exemplos de realização, são selecionados os clones ou polipeptídeos que se ligam especificamente ao antígeno alvo e não que reagem cruzadamente com nenhum outro antígeno do painel. O painel de antígenos pode incluir pelo menos três ou acima de 100 antígenos. Em alguns casos, o painel de antígeno incluí de 3 a100, de 3 a50, de 3 a 25, de 3 a 10 antígenos diferentes.

Em um exemplo de realização, é fornecido um método para

selecionar um polipeptídeo que se liga aos antígenos alvo de uma biblioteca de polipeptídeos, compreendendo em:

(a) isolar um ou mais polipeptídeos que ligam-se especificamente ao antígeno alvo pela interação à uma biblioteca que contenha uma variedade de polipeptídeos acima descrita com um antígeno alvo imobilizado sob condições adequadas para a ligação;

(b) separar um ou mais polipeptídeos que ligam-se especificamente ao antígeno alvo dos polipeptídeos que não se ligam especificamente ao antígeno alvo, e recuperar um ou mais polipeptídeos que se ligam especificamente ao antígeno alvo para obter uma subpopulação enriquecida para um ou mais polipeptídeos que se ligam especificamente ao antígeno alvo; e

(c) opcionalmente, repetir as etapas (a) - (b) pelo menos duas vezes, cada repetição usando a subpopulação enriquecida para a um ou mais polipeptídeos que ligam especificamente ao antígeno alvo obtido a partir do último ciclo de seleção.

Em um aspecto, o método consta adicionalmente de:

(d) incubar a subpopulação com uma concentração de antígeno alvo marcado em um intervalo de cerca de 0,1 nM a 1000 nM para formar uma mistura, sob condições adequadas para ligação;

(e) interagir a mistura com um agente imobilizado que se liga no antígeno alvo marcado;

(f) detectar a um ou mais polipeptídeos que ligam-se especificamente ao antígeno alvo marcado, e recuperar um ou mais polipeptídeos que liga-se especificamente ao antígeno alvo marcado do antígeno alvo marcado; e

(g) opcionalmente, repetir as etapas de (d) a (f) por pelo menos duas vezes, cada repetição usando a subpopulação enriquecida para

um ou mais polipeptídeos que ligam-se especificamente ao antígeno alvo marcado obtido a partir do última ciclo de seleção, utilizando uma concentração menor de antígeno alvo marcado do que no ciclo de seleção anterior.

Em um aspecto, o método compreendendo ainda da adição de um excesso de antígeno alvo não marcado na mistura e incubar a mistura por um período de tempo suficiente para recuperar um ou mais polipeptídeos que se ligam especificamente ao antígeno alvo com baixa afinidade. Em alguns exemplos de realização, de qualquer um dos métodos descritos no presente, uma ou mais bibliotecas, clones ou polipeptídeos são selecionados contra um painel de antígenos incluindo o antígeno alvo. Em alguns exemplos de realização, são selecionados os clones ou polipeptídeos que se ligam especificamente ao antígeno alvo e não que reagem cruzadamente com nenhum outro antígeno do painel. O painel de antígenos pode incluir pelo menos três ou acima de 100 antígenos. Em alguns casos, o painel de antígeno inclui de 3 a100, de 3 a50, de 3 a 25, de 3 a 10 antígenos diferentes.

Em um exemplo de realização, é fornecido um método para isolar um ou mais polipeptídeos que se ligam especificamente a um antígeno alvo com alta afinidade, compreendendo em:

(a) Interagir uma biblioteca que contém uma variedade de qualquer polipeptídeo descrito acima com um antígeno alvo a uma concentração de, pelo menos, 0,1 nM a 1000 nM para isolar um ou mais polipeptídeos que se ligam especificamente ao antígeno alvo;

(b) recuperar um ou mais polipeptídeos que ligam especificamente ao antígeno alvo a partir do antígeno alvo para obter uma subpopulação enriquecida para uma ou mais polipeptídeos que se ligam especificamente ao antígeno alvo; e

(c) opcionalmente repetir as etapas (a) e (b) por pelo menos duas vezes, cada repetição usando a subpopulação obtidos a partir da última

etapa e usando uma concentração decrescente de antígeno alvo do que utilizada na etapa anterior para isolar um ou mais polipeptídeos que se ligam especificamente ao antígeno alvo em uma concentração menor de antígeno alvo.

Em um exemplo de realização, é fornecido um método para selecionar um ou mais polipeptídeos que se ligam especificamente a um antígeno alvo de uma biblioteca contendo uma variedade de polipeptídeos descritos acima, compreendendo em:

(a) Interagir uma biblioteca com uma concentração de antígeno alvo marcado a uma concentração de cerca de 0,1 nM a 1000 nM sob condições ideais pra a formação de um ou mais complexos entre o antígeno alvo marcado e um ou mais polipeptídeos que se ligam ao antígeno alvo;

(b) isolar um ou mais polipeptídeos que ligam especificamente ao antígeno alvo a partir do antígeno alvo marcado para se obter uma subpopulação enriquecida para uma ou mais polipeptídeos que se ligam especificamente ao antígeno alvo; e

(c) opcionalmente repetir as etapas (a) e (b) por pelo menos duas vezes, cada repetição usando a subpopulação obtida a partir da última etapa e usando uma concentração decrescente de antígeno alvo que foi utilizada na etapa anterior.

Em um aspecto, o ensaio consta adicionalmente de na adição de um excesso de antígeno alvo não marcado para um ou mais complexos. Em um aspecto, as etapas (a) e (b) são repetidas duas vezes na qual, a concentração de antígeno alvo na primeira etapa de seleção é de cerca de 100 nM a 250 nM, na qual a concentração de antígeno alvo na segunda etapa de seleção é cerca de 25 nM a 100 nM, e na qual a concentração de antígeno alvo na segunda etapa de seleção é cerca de 0,1 nM a 25 nM.

Em um exemplo de realização, é fornecido um método para selecionar uma biblioteca que contém uma variedade de qualquer polipeptídeo

descrito acima, compreendendo em:

(a) incubar uma primeira amostra da biblioteca com um antígeno alvo em condições adequadas para a ligação do polipeptídeos ao antígeno alvo;

(b) incubar uma segunda amostra da biblioteca, na ausência de um antígeno alvo;

(c) interagir cada uma da primeira e segunda amostra com um antígeno alvo imobilizado em condições adequadas para a ligação do polipeptídeo ao antígeno alvo imobilizado;

(d) detecção dos polipeptídeos ligados ao antígeno alvo imobilizado para cada amostra, e

(e) determinar a afinidade de ligação do polipeptídeo ao antígeno alvo calculando a relação entre a quantidade de polipeptídeo ligado a partir da primeira amostra sobre a quantidade de polipeptídeo ligado a partir da segunda amostra.

Em um aspecto, o antígeno alvo é DR5 ou HER2. Em um aspecto, a concentração do antígeno alvo é cerca de 100 a 250 nM. Em um aspecto, a concentração do antígeno alvo é cerca de 25 nM a 100 nM. Em alguns exemplos de realização, um ou mais bibliotecas, clones ou polipeptídeos são selecionados contra um painel de antígenos que incluí o antígeno alvo. Em alguns exemplos de realização, são selecionados os clones ou polipeptídeos que se ligam especificamente ao antígeno alvo e não que reagem cruzadamente com nenhum outro antígeno do painel. O painel de antígenos pode incluir pelo menos três ou acima de 100 antígenos. Em alguns casos, o painel de antígeno incluí de 3 a100, de 3 a50, de 3 a 25, de 3 a 10 antígenos diferentes.

Em um exemplo de realização, um ou mais dos polipeptídeos descritos acima se ligam especificamente ao DR5 humano. Em um aspecto, o

polipeptídeo é um anticorpo que se liga especificamente ao DR5 humano. Em tal aspecto, o anticorpo compreende a região estrutural do anticorpo 4D5. Em tal aspecto, o anticorpo compreende as regiões estruturais de um anticorpo 4D5 variante. Em tal aspecto, o anticorpo é um anticorpo monoclonal. Em tal aspecto, o anticorpo é um anticorpo biespecífico. Em tal aspecto, o anticorpo é um anticorpo sintético.

Em um exemplo de realização, o anticorpo anti-DR5 compreende um domínio variável da cadeia pesada de imunoglobulina, no qual: (i) CDRH1 compreende uma seqüência de aminoácidos: G-F-X1-I-X2-X3-X4-X5-I-H (SEQ ID No: 22), no qual G é a posição 26 e X1 é a posição 28 de acordo com o sistema de numeração de Kabat; no qual X1 é selecionado a partir de S e Y; no qual X2 é selecionado a partir de Y e S; no qual, X3 é selecionado a partir de Y e S; no qual, X4 é selecionado a partir de Y e S; no qual, X5 é selecionado a partir de Y e S; (ii) CDRH2 compreende uma seqüência de aminoácidos: X1-I-X2-P-X3-X4-G-X5-T-X6-Y-A-D-S-V-K-G (SEQ ID No: 23), no qual X1 é a posição 50, de acordo com o sistema de numeração de Kabat ; no qual, X1 é selecionado a partir de Y e S; no qual X2 é selecionado a partir de Y e S; no qual, X3 é selecionado a partir de Y e S; no qual, X4 é selecionado a partir de Y e S; no qual, X5 é selecionado a partir de Y e S, e no qual X6 selecionado a partir de Y e S; e (iii) CDRH3 compreende uma seqüência de aminoácidos: X1-X2-X3-X4-X5-x6-X7-X8-X9-X10-X11-X12-X13-X.14-X15-X16-D-Y (SEQ ID No ED: 31), no qual, X1 é a posição 95 de acordo com o sistema de numeração de Kabat, e no qual X1 é selecionado a partir de R, Y, M; X2 é selecionado a partir de Y e R; X3 é selecionado a partir de Y, S, R, P e G, X4 é selecionado a partir de Y e S; X5 é selecionado a partir de Y, S, R e H; X6 é selecionado a partir de R, Y e S; X7 é selecionado a partir de G, Y e S; X8 é selecionado a partir de R, Y e S; X9 é selecionado a partir de G, Y e S; X10 é selecionado a partir de R, Y e S; X11 é selecionado a partir de G, Y e S; X12 é selecionado a partir de S, Y,

R, G e A; X13 é selecionado a partir de G e Y; X14 é selecionado a partir de L, M, R, G e A; e X15 é selecionado a partir de G, F e L ou não está presente, e X16 é F ou não está presente.

Em outro exemplo de realização, o anticorpo anti-DR5 compreende um domínio variável da cadeia pesada de imunoglobulina, no qual: (i) CDRH1 compreende uma seqüência de aminoácidos: G-F-X1-I-X2-X3-X4-X5-I-H (SEQ ID No: 22), no qual G é a posição 26 e X1 é a posição 28 de acordo com o sistema de numeração de Kabat; no qual X1 é selecionado a partir de Y e S; no qual X2 é selecionado a partir de Y e S; no qual, X3 é selecionado a partir de Y e S; no qual, X4 é selecionado a partir de Y e S; no qual, X5 é selecionado a partir de Y e S; (ii) CDRH2 compreende uma seqüência de aminoácidos: X1-I-X2-P-X3-X4-G-X5-T-X6-Y-A-D-S-V-K-G (SEQ ID No: 23), no qual X1 é a posição 50, de acordo com o sistema de numeração de Kabat ; no qual, X1 é selecionado a partir de Y e S; no qual X2 é selecionado a partir de Y e S; no qual, X3 é selecionado a partir de Y e S; no qual, X4 é selecionado a partir de Y e S; no qual, X5 é selecionado a partir de Y e S, e no qual X6 selecionado a partir de Y e S; e (iii) CDRH3 compreende uma seqüência de aminoácidos: X1-X2-X3-X4-X5-X6-X7-X8-X9-X10-X11-X12-X13-X14-X15-X16-X17-X18-X19-D-Y (SEQ ID No ED: 24), no qual, X1 é a posição 95 de acordo com o sistema de numeração de Kabat, caracterizada pelo fato dos aminoácidos em cada uma das posições de X1-X6 serem selecionados a partir de um pool de aminoácidos numa razão molar de 50% de Y, 25% de S, e 25% de G; caracterizada pelo fato dos aminoácidos em cada uma das posições de X7-X17 serem selecionados a partir de um pool de aminoácidos numa razão molar de 50% de Y, 25% de S e 25% de G, ou não estarem presentes; no qual X18 é selecionado a partir de G e A, e no qual X19 é selecionado a partir de I, M, L e F.

Em outro exemplo de realização, o anticorpo anti-DR5 compreende um domínio variável da cadeia pesada de imunoglobulina, no

qual: (i) CDRH1 compreende uma seqüência de aminoácidos: G-F-X1-I-X2-X3-X4-X5-I-H (SEQ ID No: 22), no qual G é a posição 26 e X1 é a posição 28 de acordo com o sistema de numeração de Kabat; no qual X1 é selecionado a partir de Y e S; no qual X2 é selecionado a partir de Y e S; no qual, X3 é selecionado a partir de Y e S; no qual, X4 é selecionado a partir de Y e S; no qual, X5 é selecionado a partir de Y e S; (ii) CDRH2 compreende uma seqüência de aminoácidos: X1-I-X2-P-X3-X4-G-X5-T-X6-Y-A-D-S-V-K-G (SEQ ID No: 23), no qual X1 é a posição 50, de acordo com o sistema de numeração de Kabat ; no qual, X1 é selecionado a partir de Y e S; no qual X2 é selecionado a partir de Y e S; no qual, X3 é selecionado a partir de Y e S; no qual, X4 é selecionado a partir de Y e S; no qual, X5 é selecionado a partir de Y e S, e no qual X6 selecionado a partir de Y e S; e (iii) CDRH3 compreende uma seqüência de aminoácidos: X1-X2-X3-X4-X5-X6-X7-X8-X9-X10-X11-X12-X13-X14-X15-X16-X17-X18-X19-D-Y (SEQ ID No: 26), no qual, X1 é a posição 95 de acordo com o sistema de numeração de Kabat, caracterizada pelo fato dos aminoácidos em cada uma das posições de X1-X6 serem selecionados a partir de um pool de aminoácidos numa razão molar de 25% de Y, 50% de S, e 25% de R; caracterizada pelo fato dos aminoácidos em cada uma das posições de X7-X17 serem selecionados a partir de um pool de aminoácidos numa razão molar de 25% de Y, 50% de S e 25% de R, ou não estarem presentes; no qual, X18 é selecionado a partir de G e A; e no qual, X19 é selecionado a partir de I, M, L e F.

Em outro exemplo de realização, o anticorpo anti-DR5 compreende um domínio variável da cadeia pesada de imunoglobulina, no qual: (i) CDRH1 compreende uma seqüência de aminoácidos: G-F-X1-I-X2-X3-X4-X5-I-H (SEQ ID No: 22), no qual G é a posição 26 e X1 é a posição 28 de acordo com o sistema de numeração de Kabat; no qual X1 é selecionado a partir de Y e S; no qual X2 é selecionado a partir de Y e S; no qual, X3 é selecionado a partir de Y e S; no qual, X4 é selecionado a partir de Y e S; no

qual, X5 é selecionado a partir de Y e S; (ii) CDRH2 compreende uma seqüência de aminoácidos: X1-I-X2-P-X3-X4-G-X5-T-X6-Y-A-D-S-V-K-G (SEQ ID No: 23), no qual X1 é a posição 50, de acordo com o sistema de numeração de Kabat ; no qual, X1 é selecionado a partir de Y e S; no qual X2 é selecionado a partir de Y e S; no qual, X3 é selecionado a partir de Y e S; no qual, X4 é selecionado a partir de Y e S; no qual, X5 é selecionado a partir de Y e S, e no qual X6 selecionado a partir de Y e S; e (iii) CDRH3 compreende uma seqüência de aminoácidos: X1-X2-X3-X4-X5-X6-X7-X8-X9-X10-X11-X12-X13-X14-X15-X16-X17-X18-X19-D-Y (SEQ ID No ED: 27), no qual, X1 é a posição 95 de acordo com o sistema de numeração de Kabat, caracterizada pelo fato dos aminoácidos em cada uma das posições de X1-X6 serem selecionados a partir de um pool de aminoácidos numa razão molar de 38% de Y, 25% de S, e 25% de G e 12% de R; caracterizada pelo fato dos aminoácidos em cada uma das posições de X7-X17 serem selecionados a partir de um pool de aminoácidos numa razão molar de 38% de Y, 25% de S, e 25% de G e 12% de R, ou não estarem presentes; no qual, X18 é selecionado a partir de G e A, e no qual, X19 é selecionado a partir de I, M, L e F.

Em outro exemplo de realização, o anticorpo anti-DR5 compreende um domínio variável da cadeia pesada de imunoglobulina, no qual: (i) CDRH1 compreende uma seqüência de aminoácidos: G-F-X1-I-X2-X3-X4-X5-I-H (SEQ ID No: 22), no qual G é a posição 26 e X1 é a posição 28 de acordo com o sistema de numeração de Kabat; no qual X1 é selecionado a partir de Y e S; no qual X2 é selecionado a partir de Y e S; no qual, X3 é selecionado a partir de Y e S; no qual, X4 é selecionado a partir de Y e S; no qual, X5 é selecionado a partir de Y e S; (ii) CDRH2 compreende uma seqüência de aminoácidos: X1-I-X2-P-X3-X4-G-X5-T-X6-Y-A-D-S-V-K-G (SEQ ID No: 23), no qual X1 é a posição 50, de acordo com o sistema de numeração de Kabat ; no qual, X1 é selecionado a partir de Y e S; no qual X2 é

selecionado a partir de Y e S; no qual, X3 é selecionado a partir de Y e S; no qual, X4 é selecionado a partir de Y e S; no qual, X5 é selecionado a partir de Y e S, e no qual X6 selecionado a partir de Y e S; e (iii) CDRH3 compreende uma seqüência de aminoácidos: X1-X2-X3-X4-X5-X6-X7-X8-X9-X10-X11-X12-X13-X14-X15-X16-X17-X18-X19-D-Y (SEQ ID No ED: 28), no qual, X1 é a posição 95 de acordo com o sistema de numeração de Kabat, caracterizada pelo fato dos aminoácidos em cada uma das posições de X1-X6 serem selecionados a partir de um pool de aminoácidos numa razão molar de 20% de Y, 26% de S, 26% de G, 13% de R, 1% de A, 1% de D, 1% de E, 1% de F, 1% de H, 1% de I, 1% de K, 1% de L, 1% de M, 1% de N, 1% de P, 1% de Q, 1% de T, 1% de V e 1% de W; caracterizada pelo fato dos aminoácidos em cada uma das posições de X7-X17 serem selecionados a partir de um pool de aminoácidos numa razão molar de 20% de Y, 26% de S, 26% de G, 13% de R, 1% de A, 1% de D, 1% de E, 1% de F, 1% de H, 1% de I, 1% de K, 1% de L, 1% de M, 1% de N, 1% de P, 1% de Q, 1% de T, 1% de V e 1% de W, ou não estão presentes; no qual, X18 é selecionado a partir de G e A, e no qual, X19 é selecionado a partir de I, M, L e F.

Em alguns exemplos de realização, o anticorpo anti-DR5 possuí um CDRH1 que compreende pelo menos de uma seqüência de aminoácidos selecionada de qualquer uma das SEQs ID Nos: 524-540 como demonstrado na Figura 15. O anticorpo anti-DR5 pode possuir também um CDRH2 que compreende pelo menos uma seqüência de aminoácidos selecionada de qualquer uma das SEQs ID Nos:.541-557 como demonstrado na Figura 15. O anticorpo anti-DR5 pode possuir também um CDRH3 que compreende pelo menos uma seqüência de aminoácidos selecionada de qualquer uma das SEQs ID Nos:.558-574 como demonstrado na Figura 15. Em um aspecto, um anticorpo que se liga especificamente ao DR5 humano compreendem seqüências CDRH1, CDRH2, CDRH3 e CDRL3 correspondentes as seqüências CDRH1, CDRH2, CDRH3 e CDRL3 estabelecidas na figura 15 para

qualquer uma das Fabs de 1-17.

Em alguns exemplos de realização, o anticorpo anti-DR5 possuí um CDRH1 no qual a posição do aminoácido X1 é a posição 95 e este é selecionado a partir de R e Y; X3 é a posição 97 e é S; X8 é a posição do aminoácido 100b e é S; X9 é a posição do aminoácido 100c e é Y; X10 e é a posição do aminoácido 100d e é Y ou R. Em um exemplo de realização, o CRDH3 possuí a seqüência de aminoácido X1-R-S-Y-R-Y-G-S-Y-X10-G-S-Y-X14-F-D-Y (SEQ ID No:575). Em um exemplo de realização específico, um anticorpo anti-DR5 possuí um domínio variável de cadeia pesada que compreende: i) um CDRH1 contendo uma seqüência de aminoácidos GFYISSSSIH (SEQ ID No: 576); ii) um CDRH2 contendo uma seqüência de aminoácidos SISPSSGSTYYADSVKG (SEQ NO ID: 577); e iii) um CDRH3 contendo uma seqüência de aminoácidos YRSYRYGSYYGSYGFDY (SEQ NO ID: 578). Em outro exemplo de realização específico, um anticorpo anti-DR5 possuí um domínio variável de cadeia pesada que compreende: i) um CDRH1 contendo uma seqüência de aminoácidos GFYISSSSIH (SEQ ID No: 579); ii) um CDRH2 contendo uma seqüência de aminoácidos SISPSSGYTSYADSVKG (SEQ NO ID: 580); e iii) um CDRH3 contendo uma seqüência de aminoácidos RRSYRYGSYRGSYAFDY (SEQ NO ID: 581).

Em alguns exemplos de realização, o anticorpo anti-DR5 possuí um CDRH1 compreendendo uma seqüência de aminoácido GFXIIX2SSSIH (SEQ ID No: 598) no qual, X1 e X2 são Y ou S. Em outro exemplo de realização, o anticorpo anti-DR5 possuí um CDRH2 compreendendo uma seqüência de aminoácido X1ISPX3X4GYTX6YADSKVG (SEQ ID No: 599) e no qual, X1, X2, X4 e X6 são Y ou S. Em outro exemplo de realização, o anticorpo anti-DR5 possuí um CDRH3 compreendendo uma seqüência de aminoácido YRX3YRYGX8X9X10GSYX14X15DY (SEQ ID No:596), no qual X3 é selecionado a partir de Y, S, R, P e G; X8 é selecionado a partir de R, Y e S;

X9 é selecionado a partir de G, Y e S; X10 é selecionado a partir de S, Y e R; X14 é selecionado a partir de G e A e X15 é selecionado a partir de L e F.

Em alguns exemplos de realização, o anticorpo anti-DR5 se liga ao DR5 humano com uma IC_{50} de 1 a 20 nM. Em outro exemplo de realização, o anticorpo anti-DR5 se liga ao DR5 murino.

Os anticorpos anti-DR5 podem opcionalmente possuir um domínio variável de cadeia leve, no qual: (i) CDRL3 compreende uma seqüência de aminoácidos Q-Q-X1-X2-X3-X4-P-X5-T (ID SEQ NO: 25); no qual, X1 é a posição 91 e é selecionado a partir de Y, H e S; X2 é selecionado de Y e S; X3 é selecionado de Y, S e T; X4 é selecionado de Y, S e T, e X5 é selecionado de S, P e Y. Os anticorpos anti-DR5 podem opcionalmente possuir um domínio variável de cadeia leve, no qual CDRL3 compreende uma seqüência de aminoácidos QQXIX2X3SPST (SEQ ID No: 597), no qual X1, X2 e X3 são Y ou S. O domínio variável da cadeia leve pode adicionalmente possuir um CDRL3 que compreende uma seqüência de aminoácido de um grupo que consiste das SEQs ID Nos: 507 a 523, como demonstrado na Figura 15. O anticorpo pode constar adicionalmente de um CDRL1 que compreende uma seqüência de aminoácido RASQDVNTAVA (SEQ ID No: 29). O anticorpo pode constar adicionalmente de um CDRL2 que compreende uma seqüência de aminoácido SASSLYS (SEQ ID No: 30).

Em um aspecto, os anticorpos específicos para DR5 são selecionados para a atividade de agonista ou antagonista. Esses anticorpos podem ser selecionados em um ensaio de sinalização com o receptor DR5, tal como um ensaio de apoptose como descrito no presente. Os anticorpos agonistas aumentam a apoptose quando comparado com o controle e o anticorpo antagonista diminuí a apoptose.

Em um exemplo de realização, é fornecido um polinucleotídeo isolado codifica um dos anticorpos descritos acima que liga especificamente ao

DR5 humano. Em um exemplo de realização, é fornecido um vetor contendo um polinucleotídeo isolado que codifica um dos anticorpos descritos acima que se liga especificamente ao DR5 humano. Em exemplo de realização, é fornecida uma célula hospedeira transformada com um vetor contendo um polinucleotídeo isolado que codifica um dos anticorpos descritos acima que se liga especificamente ao DR5 humano. Em exemplo de realização, é fornecido um processo de produção de anticorpo, compreendendo de uma cultura de célula hospedeira transformadas com um vetor contendo um polinucleotídeo isolado que codifica um dos anticorpos acima descritos que se ligam especificamente ao DR5 humano de tal forma que o polinucleotídeo é expresso. Em um aspecto, o processo compreende ainda na recuperação do anticorpo a partir da cultura da célula hospedeira. Em um aspecto, o processo compreende adicionalmente da recuperação do anticorpo do meio de cultura da célula hospedeira.

Em um exemplo de realização, é fornecido um método de uso de um ou mais anticorpos descritos acima que se ligam especificamente ao DR5 humano para tratar uma doença associada à angiogênese anormal em um mamífero que necessite de tal tratamento, compreendendo a etapa de administrar um ou mais anticorpos ao mamífero. Em alguns exemplos de realização, os anticorpos contra DR5 que inibem a apoptose podem ser úteis em condições na qual a inibição da morte celular é pretendida (por exemplo, degeneração macular). Em um aspecto, a desordem é o câncer. Em alguns exemplos de realização, o anticorpo anti-DR5 aumenta a apoptose. Em um desses aspectos, o câncer é selecionado a partir de câncer de mama, câncer colorretal, câncer de pulmão de não-pequenas células, linfoma não-Hodgkin (NHL), câncer renal, câncer de próstata, câncer de fígado, câncer de cabeça e pescoço, melanoma, câncer de ovário, mesotelioma e mieloma múltiplo. Em outro aspecto, o tratamento inclui ainda a etapa de administração de um

segundo agente terapêutico de maneira simultânea ou seqüencial com o anticorpo. Em tal aspecto, o segundo agente terapêutico é selecionada a partir de um agente anti-angiogênico, agente anti-neoplásico, agente quimioterápico e agente citotóxico.

Em um exemplo de realização, é fornecido um método para tratar um mamífero que sofre ou possui o risco de desenvolver um distúrbio inflamatório ou imunológico, compreendendo a etapa de tratamento do mamífero com um ou mais Fabs de um ou mais anticorpos descritos acima que se ligam especificamente ao DR5 humano. Em um aspecto, o distúrbio é imune inflamatória ou artrite reumatóide. Em alguns exemplos de realização, o anticorpo anti-DR5 aumenta a apoptose.

Os métodos descritos no presente também fornecem para ser isolado um anticorpo anti-HER2. Em um exemplo de realização o anticorpo anti-HER2 compreende um domínio variável da cadeia pesada de imunoglobulina, no qual: (i) CDRH1 compreende uma seqüência de aminoácidos: G-F-X1-I-X2-X3-X4-X5-I-H (SEQ ID No: 22), no qual G é a posição 26 e X1 é a posição 28 de acordo com o sistema de numeração de Kabat; no qual X1 é selecionado a partir de Y e S; no qual X2 é selecionado a partir de Y e S; no qual, X3 é selecionado a partir de Y e S; no qual, X4 é selecionado a partir de Y e S; no qual, X5 é selecionado a partir de Y e S; (ii) CDRH2 compreende uma seqüência de aminoácidos: X1-I-X2-P-X3-X4-G-X5-T-X6-Y-A-D-S-V-K-G (SEQ ID No: 23), no qual X1 é a posição 50, de acordo com o sistema de numeração de Kabat ; no qual, X1 é selecionado a partir de Y e S; no qual X2 é selecionado a partir de Y e S; no qual, X3 é selecionado a partir de Y e S; no qual, X4 é selecionado a partir de Y e S; no qual, X5 é selecionado a partir de Y e S, e no qual X6 selecionado a partir de Y e S; e (iii) CDRH3 compreende uma seqüência de aminoácidos: X1-X2-X3-X4-X5-X6-X7-D-Y (SEQ ID No: 582), no qual, X1 é a posição do aminoácido 95 de acordo

com o sistema de numeração de Kabat e é selecionado a partir de S e Y; X2 é selecionado a partir de S e Y e R; X3 é selecionado de S, G, Y e H; X4 é selecionado de S, G, Y e R; X5 é selecionado de G e A; X6 é selecionado de F, M, L e A; e X7 é selecionado de F, M e L ou está ausente.

Em outra realização, o anticorpo anti-HER2 contém um domínio variável da cadeia pesada de imunoglobulina que compreende: (i) CDRH1 compreende uma seqüência de aminoácidos: G-F-X1-I-X2-X3-X4-X5-I-H (SEQ ID No: 22), no qual, X1 é a posição 28 de acordo com o sistema de numeração de Kabat e é selecionado de S e Y; X2 é selecionado a partir de S e Y; X3 é selecionado a partir de S e Y; X4 é selecionado de S e Y; X5 é selecionado de S e Y; (ii) CDRH2 compreende uma seqüência de aminoácidos: X1-I-X2-P-X3-X4-G-X5-T-X6-Y-A-D-S-V-K-G (SEQ ID No: 23), no qual, X1 é a posição 50, de acordo com o sistema de numeração de Kabat e é selecionado a partir de S e Y; X2 é selecionado de S e Y; X3 é selecionado de S e Y; X4 é selecionado de S e Y; X5 é selecionado de S e Y, e (iii) CDRH3 compreende uma seqüência de aminoácidos: X1-X2-X3-X4-X5-X6-X7-X8-D-Y (SEQ ID No: 583), no qual, X1 é a posição do aminoácido 95 de acordo com o sistema de numeração de Kabat e é selecionado a partir de Y, S e G; X2 é selecionado a partir de Y, S, G, R e A; X3 é selecionado de G, Y, S e R; X4 é selecionado de G, Y e F; X5 é selecionado de Y, S, N e G; X6 é selecionado de Y, R, H e W; e X7 é selecionado a partir de G e A; e X8 é selecionado a partir de F, M, L e I.

Em outra realização, o anticorpo anti-HER2 contém um domínio variável da cadeia pesada de imunoglobulina que compreende: (i) CDRH1 compreende uma seqüência de aminoácidos: G-F-X1-I-X2-X3-X4-X5-I-H (SEQ ID No: 22), no qual, X1 é a posição 28 de acordo com o sistema de numeração de Kabat e é selecionado de S e Y; X2 é selecionado a partir de S e Y; X3 é selecionado a partir de S e Y; X4 é selecionado de S e Y; X5 é selecionado de S e Y; (ii) CDRH2 compreende uma seqüência de aminoácidos: X1-I-X2-P-X3-

X4-G-X5-T-X6-Y-A-D-S-V-K-G (SEQ ID No: 23), no qual, X1 é a posição 50, de acordo com o sistema de numeração de Kabat e é selecionado a partir de S e Y; X2 é selecionado de S e Y; X3 é selecionado de S e Y; X4 é selecionado de S e Y; X5 é selecionado de S e Y, e (iii) CDRH3 compreende uma seqüência de aminoácidos: X1-X2-X3-X4-X5-X6-X7-X8-X9-X10-X11-X12-X13-X14-X15-X16-X17-X18-X19-D-Y (SEQ ID No: 584), no qual, X1 é a posição do aminoácido 95 e é selecionado a partir de Y, S, R e G; X2 é selecionado a partir de Y, S, R e G; X3 é selecionado de S, Y, G e W; X4 é selecionado de S, Y, G e Q; X5 é selecionado a partir de G, Y e S; X6 é selecionado a partir de G, Y S, R e V; X7 é selecionado a partir de S, Y, G e R; X8 é selecionado a partir de Y, S, G, R, P e V; X9 é selecionado a partir de G, A,Y,S e R; X10 é selecionado de M, F, G, Y, S e R; X11 é selecionado de A, Y, S, G e R; X12 é selecionado de I, M, F, L, A, G, S, Y, R e T; X13 é selecionado de F, M, L, G, A,Y, T E S ou não está presente; X14 é selecionado de L, M, F, I, G, Y, A e T; e X15 é selecionado de M, L, Y, G e R ou não está presente; X16 é selecionado de Y e G ou não está presente; X17 é selecionado de R, M e G ou não está presente; X18 é selecionado a partir de P e A ou não está presente; e X18 é L ou não está presente.

Ainda em outro exemplo de realização, o anticorpo anti-HER2 consta de um domínio variável da cadeia pesada de imunoglobulina que compreende: (i) CDRH1 compreende uma seqüência de aminoácidos: G-F-X1-I-X2-X3-X4-X5-I-H (SEQ ID No: 22), no qual G é a posição 26 e X1 é a posição 28 de acordo com o sistema de numeração de Kabat; no qual X1 é selecionado a partir de S e Y; no qual X2 é selecionado a partir de Y e S; no qual, X3 é selecionado a partir de Y e S; no qual, X4 é selecionado a partir de Y e S; no qual, X5 é selecionado a partir de Y e S; (ii) CDRH2 compreende uma seqüência de aminoácidos: X1-I-X2-P-X3-X4-G-X5-T-X6-Y-A-D-S-V-K-G (SEQ ID No: 23), no qual X1 é a posição 50, de acordo com o sistema de numeração

de Kabat ; no qual, X1 é selecionado a partir de Y e S; no qual X2 é selecionado a partir de Y e S; no qual, X3 é selecionado a partir de Y e S; no qual, X4 é selecionado a partir de Y e S; no qual, X5 é selecionado a partir de Y e S, e no qual X6 selecionado a partir de Y e S; e (iii) CDRH3 compreende uma seqüência de aminoácidos: X1-X2-X3-X4-X5-x6-X7-X8-X9-X10-X11-X12-X13-X14-X15-X16-X17-X18-X19-D-Y (SEQ ID No: 24), no qual, X1 é a posição 95 de acordo com o sistema de numeração de Kabat, caracterizada pelo fato dos aminoácidos em cada uma das posições de X1-X6 serem selecionados a partir de um *pool* de aminoácidos numa razão molar de 50% de Y, 25% de S, e 25% de G; caracterizada pelo fato dos aminoácidos em cada uma das posições de X7-X17 serem selecionados a partir de um pool de aminoácidos numa razão molar de 50% de Y, 25% de S e 25% de G, ou não estarem presentes; no qual X18 é selecionado a partir de G e A, e no qual X19 é selecionado a partir de I, M, L e F.

Ainda em outro exemplo de realização, o anticorpo anti-HER2 consta de um domínio variável da cadeia pesada de imunoglobulina, no qual: (i) CDRH1 compreende uma seqüência de aminoácidos: G-F-X1-I-X2-X3-X4-X5-I-H (SEQ ID No: 22), no qual G é a posição 26 e X1 é a posição 28 de acordo com o sistema de numeração de Kabat; no qual X1 é selecionado a partir de S e Y; no qual X2 é selecionado a partir de Y e S; no qual, X3 é selecionado a partir de Y e S; no qual, X4 é selecionado a partir de Y e S; no qual, X5 é selecionado a partir de Y e S; (ii) CDRH2 compreende uma seqüência de aminoácidos: X1-I-X2-P-X3-X4-G-X5-T-X6-Y-A-D-S-V-K-G (SEQ ID No: 23), no qual X1 é a posição 50, de acordo com o sistema de numeração de Kabat ; no qual, X1 é selecionado a partir de Y e S; no qual X2 é selecionado a partir de Y e S; no qual, X3 é selecionado a partir de Y e S; no qual, X4 é selecionado a partir de Y e S; no qual, X5 é selecionado a partir de Y e S, e no qual X6 selecionado a partir de Y e S; e (iii) CDRH3 compreende uma seqüência de aminoácidos: X1-X2-X3-X4-X5-X6-X7-X8-X9-X10-X11-X12-X13-X14-X15-X16-

X17-X18-X19-D-Y (SEQ ID No: 26), no qual, X1 é a posição 95 de acordo com o sistema de numeração de Kabat, caracterizada pelo fato dos aminoácidos em cada uma das posições de X1-X6 serem selecionados a partir de um *pool* de aminoácidos numa razão molar de 25% de Y, 50% de S, e 25% de R; caracterizada pelo fato dos aminoácidos em cada uma das posições de X7-X17 serem selecionados a partir de um pool de aminoácidos numa razão molar de 25% de Y, 50% de S e 25% de R, ou não estarem presentes; no qual, X18 é selecionado a partir de G e A; e no qual, X19 é selecionado a partir de I, M, L e F.

Ainda em outro exemplo de realização, o anticorpo anti-HER2 consta de um domínio variável da cadeia pesada de imunoglobulina, no qual: (i) CDRH1 compreende uma seqüência de aminoácidos: G-F-X1-I-X2-X3-X4-X5-I-H (SEQ ID No: 22), no qual G é a posição 26 e X1 é a posição 28 de acordo com o sistema de numeração de Kabat; no qual X1 é selecionado a partir de S e Y; no qual X2 é selecionado a partir de Y e S; no qual, X3 é selecionado a partir de Y e S; no qual, X4 é selecionado a partir de Y e S; no qual, X5 é selecionado a partir de Y e S; (ii) CDRH2 compreende uma seqüência de aminoácidos: X1-I-X2-P-X3-X4-G-X5-T-X6-Y-A-D-S-V-K-G (SEQ ID No: 23), no qual X1 é a posição 50, de acordo com o sistema de numeração de Kabat ; no qual, X1 é selecionado a partir de Y e S; no qual X2 é selecionado a partir de Y e S; no qual, X3 é selecionado a partir de Y e S; no qual, X4 é selecionado a partir de Y e S; no qual, X5 é selecionado a partir de Y e S, e no qual X6 selecionado a partir de Y e S; e (iii) CDRH3 compreende uma seqüência de aminoácidos: X1-X2-X3-X4-X5-X6-X7-X8-X9-X10-X11-X12-X13-X14-X15-X16-X17-X18-X19-D-Y (SEQ ID No: 27), no qual, X1 é a posição 95 de acordo com o sistema de numeração de Kabat, caracterizada pelo fato dos aminoácidos em cada uma das posições de X1-X6 serem selecionados a partir de um pool de aminoácidos numa razão molar de 38% de Y, 25% de S, e 25% de G e 12% de R; caracterizada pelo fato dos aminoácidos em cada uma das posições de X7-

X17 serem selecionados a partir de um pool de aminoácidos numa razão molar de 38% de Y, 25% de S, e 25% de G e 12% de R, ou não estarem presentes; no qual, X18 é selecionado a partir de G e A, e no qual, X19 é selecionado a partir de I, M, L e F.

Ainda em outro exemplo de realização, o anticorpo anti-HER2 consta de um domínio variável da cadeia pesada de imunoglobulina, no qual: (i) CDRH1 compreende uma seqüência de aminoácidos: G-F-X1-I-X2-X3-X4-X5-I-H (SEQ ID No: 22), no qual G é a posição 26 e X1 é a posição 28 de acordo com o sistema de numeração de Kabat; no qual X1 é selecionado a partir de S e Y; no qual X2 é selecionado a partir de Y e S; no qual, X3 é selecionado a partir de Y e S; no qual, X4 é selecionado a partir de Y e S; no qual, X5 é selecionado a partir de Y e S; (ii) CDRH2 compreende uma seqüência de aminoácidos: X1-I-X2-P-X3-X4-G-X5-T-X6-Y-A-D-S-V-K-G (SEQ ID No: 23), no qual X1 é a posição 50, de acordo com o sistema de numeração de Kabat ; no qual, X1 é selecionado a partir de Y e S; no qual X2 é selecionado a partir de Y e S; no qual, X3 é selecionado a partir de Y e S; no qual, X4 é selecionado a partir de Y e S; no qual, X5 é selecionado a partir de Y e S, e no qual X6 selecionado a partir de Y e S; e (iii) CDRH3 compreende uma seqüência de aminoácidos: X1-X2-X3-X4-X5-X6-X7-X8-X9-X10-X11-X12-X13-X14-X15-X16-X17-X18-X19-D-Y (SEQ ID No ED: 28), no qual, X1 é a posição 95 de acordo com o sistema de numeração de Kabat, caracterizada pelo fato dos aminoácidos em cada uma das posições de X1-X6 serem selecionados a partir de um pool de aminoácidos numa razão molar de 20% de Y, 26% de S, 26% de G, 13% de R, 1% de A, 1% de D, 1% de E, 1% de F, 1% de H, 1% de I, 1% de K, 1% de L, 1% de M, 1% de N, 1% de P, 1% de Q, 1% de T, 1% de V e 1% de W; caracterizada pelo fato dos aminoácidos em cada uma das posições de X7-X17 serem selecionados a partir de um pool de aminoácidos numa razão molar de 20% de Y, 26% de S, 26% de G, 13% de R, 1% de A, 1% de D, 1% de E,

1% de F, 1% de H, 1% de I, 1% de K, 1% de L, 1% de M, 1% de N, 1% de P, 1% de Q, 1% de T, 1% de V e 1% de W, ou não estão presentes; no qual, X18 é selecionado a partir de G e A, e no qual, X19 é selecionado a partir de I, M, L e F.

Ainda em outro exemplo de realização, o anticorpo anti-HER2 consta de um domínio variável da cadeia pesada de imunoglobulina, no qual: (i) CDRH1 compreende uma seqüência de aminoácidos: G-F-X1-I-X2-X3-X4-X5-I-H (SEQ ID No: 22), no qual G é a posição 26 e X1 é a posição 28 de acordo com o sistema de numeração de Kabat; no qual X1 é selecionado a partir de S e Y; no qual X2 é selecionado a partir de Y e S; no qual, X3 é selecionado a partir de Y e S; no qual, X4 é selecionado a partir de Y e S; no qual, X5 é selecionado a partir de Y e S; (ii) CDRH2 compreende uma seqüência de aminoácidos: X1-I-X2-P-X3-X4-G-X5-T-X6-Y-A-D-S-V-K-G (SEQ ID No: 23), no qual X1 é a posição 50, de acordo com o sistema de numeração de Kabat ; no qual, X1 é selecionado a partir de Y e S; no qual X2 é selecionado a partir de Y e S; no qual, X3 é selecionado a partir de Y e S; no qual, X4 é selecionado a partir de Y e S; no qual, X5 é selecionado a partir de Y e S, e no qual X6 selecionado a partir de Y e S; e (iii) CDRH3 compreende uma seqüência de aminoácidos: X1-X2-X3-X4-X5-X6-X7-X8-X9-X10-X11-X12-X13-X14-X15-X16-X17-X18-X19 (SEQ ID No.: ___), caracterizado pelo fato de que X1 é a posição 95 de acordo com o sistema de numeração de Kabat, e no qual os aminoácidos em cada uma das posições de X1-X19 são selecionadas a partir de A, C, F, G, I, L, N, P, R, T, W ou Y, ou não estão presentes; X18 é selecionado a partir de G e A; e X19 é selecionado a partir de F, L, I, e M ou não está presente.

Ainda em outro exemplo de realização, o anticorpo anti-HER2 consta de um domínio variável da cadeia pesada de imunoglobulina, no qual: (i) CDRH1 compreende uma seqüência de aminoácidos: G-F-X1-I-X2-X3-X4-X5-I-H (SEQ ID No: 22), no qual G é a posição 26 e X1 é a posição 28 de acordo

com o sistema de numeração de Kabat; no qual X1 é selecionado a partir de S e Y; no qual X2 é selecionado a partir de Y e S; no qual, X3 é selecionado a partir de Y e S; no qual, X4 é selecionado a partir de Y e S; no qual, X5 é selecionado a partir de Y e S; (ii) CDRH2 compreende uma seqüência de aminoácidos: X1-I-X2-P-X3-X4-G-X5-T-X6-Y-A-D-S-V-K-G (SEQ ID No: 23), no qual X1 é a posição 50, de acordo com o sistema de numeração de Kabat ; no qual, X1 é selecionado a partir de Y e S; no qual X2 é selecionado a partir de Y e S; no qual, X3 é selecionado a partir de Y e S; no qual, X4 é selecionado a partir de Y e S; no qual, X5 é selecionado a partir de Y e S, e no qual X6 selecionado a partir de Y e S; e (iii) CDRH3 compreende uma seqüência de aminoácidos: X1-X2-X3-X4-X5-X6-X7-X8-X9-X10-X11-X12-X13-X14-X15-X16-X17-X18-X19 (SEQ ID No.: ___), caracterizado pelo fato de que X1 é a posição 95 de acordo com o sistema de numeração de Kabat, e os aminoácidos em cada uma das posições de X1-X19 são selecionadas a partir S e um dentre Y, W, R ou F, ou não estão presentes; X18 é selecionado a partir de G e A; e X19 é selecionado a partir de F, L, I, e M.

Em alguns exemplos de realização da invenção, o anticorpo anti-HER2 pode constar de um CDRH1 que compreende pelo menos de uma seqüência de aminoácidos selecionada de um grupo consistindo de uma das SEQs ID Nos: 189-294 como demonstrado na Figura 11. O anticorpo anti-HER2 pode constar também de um CDRH2 que compreende de pelo menos de uma seqüência de aminoácidos selecionada de um grupo consistindo de uma das SEQs ID Nos: 295-400, como demonstrado na Figura 11. O anticorpo anti-HER2 pode constar também de um CDRH3 que compreende pelo menos de uma seqüência de aminoácidos de um grupo consistindo de uma das SEQs ID Nos: 401-506 como demonstrado na Figura 11. Em alguns exemplos de realização da invenção, o anticorpo anti-HER2 pode constar de um CDRH1 que compreende pelo menos de uma seqüência de aminoácidos selecionada de um

grupo consistindo de uma das SEQs ID Nos: 816-842 como demonstrado na Figura 21. O anticorpo anti-HER2 pode constar também de um CDRH2 que compreende de pelo menos de uma seqüência de aminoácidos selecionada de um grupo consistindo de uma das SEQs ID Nos: 843-869, como demonstrado na Figura 21. O anticorpo anti-HER2 pode constar também de um CDRH3 que compreende pelo menos de uma seqüência de aminoácidos de um grupo consistindo de uma das SEQs ID Nos: 870-896 como demonstrado na Figura 21. Em alguns exemplos de realização da invenção, o anticorpo anti-HER2 pode constar de um CDRH1 que compreende pelo menos de uma seqüência de aminoácidos selecionada de um grupo consistindo de uma das SEQs ID Nos: 924-950 como demonstrado na Figura 24A. O anticorpo anti-HER2 pode constar também de um CDRH2 que compreende de pelo menos de uma seqüência de aminoácidos selecionada de um grupo consistindo de uma das SEQs ID Nos: 951-977, como demonstrado na Figura 24A. O anticorpo anti-HER2 pode constar também de um CDRH3 que compreende pelo menos de uma seqüência de aminoácidos de um grupo consistindo de uma das SEQs ID Nos: 978-1004 como demonstrado na Figura 24A.

Em um aspecto, um anticorpo que se liga especificamente ao HER2 humano compreende as seqüências CDRH1, CDRH2, CDRH3 e CDRL3 correspondentes as seqüências CDRH1, CDRH2, CDRH3 e CDRL3 estabelecidas na figura 11 para qualquer uma das Fabs de 1-106. Em um aspecto, um anticorpo que se liga especificamente ao HER2 humano compreende as seqüências CDRH1, CDRH2, CDRH3 e CDRL3 correspondentes as seqüências CDRH1, CDRH2, CDRH3 e CDRL3 estabelecidas na figura 21A para qualquer uma dos clones de B1-B28. Em outro aspecto, um anticorpo que se liga especificamente ao HER2 humano compreende as seqüências CDRH1, CDRH2, CDRH3 e CDRL3 correspondentes as seqüências CDRH1, CDRH2, CDRH3 e CDRL3

estabelecidas na figura 24A para qualquer uma dos clones de G29 a G61.

Em alguns exemplos de realização, um anticorpo anti-HER2 possuí um CDRH1 compreendendo uma seqüência de aminoácido GFSIX2X3SYIH (SEQ ID No: 588) no qual, X2 e X3 são Y ou S. Um anticorpo anti-HER2 possuí um CDRH2 compreendendo uma seqüência de aminoácido SIYPX3SGYTSYADSKVG (SEQ ID No:589) e no qual, X3 é Y ou S. Um anticorpo anti-HER2 pode possuir adicionalmente um domínio variável de cadeia leva CDRL1 compreendendo uma seqüência de aminoácido QQSYYX4PST (SEQ ID No:587), no qual X4 é Y ou S.

Em alguns exemplos de realização, um anticorpo anti-HER2 possuí uma seqüência de aminoácido GFX1ISYSSIH (SEQ ID No: 590) no qual, X1 é Y ou S. Um anticorpo anti-HER2 possuí adicionalmente um CDRH2 compreendendo uma seqüência de aminoácido SIYPX3YGX5TX6YADSKVG (SEQ ID No:591) e no qual, X3, X5 e X6 são Y ou S.

Em alguns exemplos de realização, um anticorpo anti-HER2 possuí um CDRH1 compreendendo uma seqüência de aminoácido GFXIISSSSSIH (SEQ ID No: 593) no qual, X1 é Y ou S. Um anticorpo anti-HER2 pode possuir adicionalmente um CDRH2 que possuí uma seqüência de aminoácido X1DC2PSSGYTX6YADSKVG (SEQ ID No:594) e no qual, X1, X2 e X6 são Y ou S. Um anticorpo anti-HER2 pode possuir adicionalmente um CDRH3 que possuí uma seqüência de aminoácido XEX2X3X4YYSYYX10GX12X13X14DY (SEQ ID No:592) e no qual, X1 é selecionado de Y, S e R, X2 é selecionado de Y e S; X3 é selecionado de G, Y e S; X4 é selecionado de G, Y e S; X4 é selecionado de Y, S, R e G; X10 é selecionado de Y, S e G, X12 é selecionado de Y, S e G; X13 é selecionado de G e A e X14 é selecionado de I, F, M e L.

Em alguns exemplos de realização, o anticorpo anti-DR5 pode opcionalmente possuir um domínio variável de cadeia leve, no qual: o CDRL3

compreende uma seqüência de aminoácidos Q-Q-X1-X2-X3-X4-P-X5-T (ID SEQ NO: 25); no qual, X1 é a posição 91 e é selecionado a partir de S e Y; X2 é selecionado de S, Y e L; X3 é selecionado de Y, S e F; X4 é selecionado de Y e S, e X5 é selecionado de S e Y. O domínio variável da cadeia leve pode adicionalmente possuir um CDRL3 que compreende uma seqüência de aminoácido de um grupo que consiste das SEQs ID Nos: 83 a 188, como demonstrado na Figura 11, SEQs ID Nos: 789 a 815, como demonstrado na Figura 21A e SEQs ID Nos: 897 a 923, como demonstrado na Figura 24A. O anticorpo pode constar adicionalmente de um CDRL1 que compreende uma seqüência de aminoácido RASQDVNTAVA (SEQ ID No: 29). O anticorpo pode constar adicionalmente de um CDRL2 que compreende uma seqüência de aminoácido SASSLYS (SEQ ID No: 30).

Em um aspecto, o polipeptídeo é um anticorpo específico que se liga a HER2. Em tal aspecto, o anticorpo compreende a região estrutural do anticorpo 4D5. Em tal aspecto, o anticorpo compreende a região estrutural de um variante de anticorpo 4D5. Em tal aspecto, o anticorpo é um anticorpo monoclonal. Em tal aspecto, o anticorpo é um anticorpo biespecífico.

Em um exemplo de realização, é fornecido um polinucleotídeo isolado que codifica um dos anticorpos descritos acima que liga especificamente ao HER2 humano. Em um exemplo de realização, é fornecido um vetor contendo um polinucleotídeo isolado que codifica um dos anticorpos descritos acima que se liga especificamente ao HER2 humano. Em exemplo de realização, é fornecida uma célula hospedeira transformada co m um vetor contendo um polinucleotídeo isolado que codifica um dos anticorpos descritos acima que se liga especificamente ao HER2 humano. Em exemplo de realização, é fornecido um processo de produção de anticorpo, compreendendo de uma cultura de célula hospedeira transformadas com um vetor contendo um polinucleotídeo isolado que codifica um dos anticorpos

acima descritos que se ligam especificamente ao HER2 humano de forma que o polinucleotídeo é expresso. Em um aspecto, o processo compreende ainda na recuperação do anticorpo a partir da cultura da célula hospedeira. Em um aspecto, o processo compreende adicionalmente da recuperação do anticorpo do meio de cultura da célula hospedeira.

Em um exemplo de realização, é fornecido um método de uso de um ou mais anticorpos descritos acima que se ligam especificamente ao HER2 humano para tratar uma desordem associada a HER2, compreendendo a etapa de administrar um ou mais anticorpos ao mamífero. Em outro aspecto, o tratamento consta da etapa de administração de um segundo agente terapêutico simultaneamente ou seqüencialmente com o anticorpo. Em tal aspecto, o segundo agente terapêutico é selecionado a partir de uma agente anti-angiogênico, agente anti-neoplásico, agente quimioterápico e agente citotóxico.

Em um exemplo de realização, um método de tratamento de um mamífero a partir de sofre ou possuí risco de desenvolver um distúrbio relacionado com HER2, incluí a etapa de tratamento do mamífero com um ou mais Fabs de um ou mais anticorpos descritos acima que se ligam especificamente ao HER2. Em um exemplo de realização, um ou mais dos polipeptídeos descritos acima se liga especificamente ao HER2.

Em um aspecto, um polipeptídeo da invenção inclui pelo menos um, ou ambos, domínio variável de cadeia pesada e leve, no qual o anticorpo domínio variável compreende uma, duas ou três CDRs variantes como descrito no presente (por exemplo, como descrito anteriormente).

Em um exemplo de realização, um polipeptídeo da invenção (especificamente aquele que compreende um domínio variável de anticorpo) possuem adicionalmente uma seqüência da região estrutural do anticorpo, por exemplo, FR1, FR2, FR3, e/ou FR4 para um polipeptídeo do domínio variável

correspondente à variante CDR, as seqüências FR obtidas a partir de um único anticorpo modelo. Em tais exemplos, as seqüências FR são obtidas de anticorpos humanos. Em tais exemplos, as seqüências FR são obtidas da seqüência de consenso humano (por exemplo, seqüência de consenso subgrupo III). Em um exemplo de realização, a seqüências da região estrutural compreende uma seqüência consenso modificada como descrito no presente (por exemplo, compreendendo modificações na posição 49, 71, 93 e/ou 94 na cadeia pesada, e/ou na posição 66, da cadeia leve). Em um exemplo de realização, as regiões estruturais têm as seqüências da região estrutural do anticorpo 4D5-8 humanizado do tipo selvagem cadeia leve e pesada (mostrado na figura 16 (SEQ ID Nos: 6-9 e 10-13, respectivamente)). Em um exemplo de realização, a região estrutural têm seqüências da região estrutural de uma versão variante do anticorpo humanizado 4D5-8 cadeia leve e pesada, no qual a cadeia leve é modificada na posição 66 e a cadeia pesada é modificada nas posições 71, 73 e 78 (como demonstrado na figura 17 (SEQ ID Nos: 14-17 e 18-21)).

Em alguns exemplos de realização, um polipeptídeo da invenção consta de um domínio variável de uma cadeia leve e cadeia pesada de anticorpo, no qual o domínio variável de cadeia leve inclui, pelo menos, 1, 2 ou 3 variantes selecionados entre o grupo de CDRs constituído por CDR L1, L2 e L3, e o domínio variável de cadeia pesada inclui, pelo menos, 1, 2 ou 3 variante selecionados entre o grupo de CDRs constituído por CDR H1, H2 e H3.

Em alguns exemplos de realização, um polipeptídeo da invenção é um ScFv. Em alguns exemplos de realização, é um fragmento Fab. Em alguns exemplos de realização, é um F(ab)2 ou F(ab')2. Assim, em alguns exemplos de realização, um polipeptídeo da invenção inclui ainda um domínio de dimerização. Em alguns exemplos de realização, o domínio de dimerização está localizado entre um domínio variável de cadeia pesada ou domínio variável de cadeia leve do anticorpo a pelo menos uma parte de uma proteína

da cápside viral. O domínio de dimerização pode incluir uma seqüência de dimerização e/ou uma seqüência que inclua um ou mais resíduos cisteína. O domínio de dimerização pode estar ligado, direta ou indiretamente, à extremidade C-terminal de um domínio variável de cadeia pesada ou domínio constante. A estrutura do domínio de dimerização pode ser variada, dependendo se o domínio variável do anticorpo é produzido como um componente da proteína de fusão com o componente da proteína da cápside viral (por exemplo, sem um códon de parada após o domínio de dimerização) ou se o domínio variável do anticorpo é produzido predominantemente sem o componente da proteína da cápside viral (por exemplo, com um códon de parada após o domínio de dimerização). Quando o domínio variável do anticorpo é produzido predominantemente como uma proteína de fusão com o componente da proteína da cápside viral, uma ou mais ligações de dissulfeto e/ou seqüência de dimerização única fornece uma exibição bivalente. Para os domínios variáveis do anticorpo predominantemente produzidos não sendo fundido a um componente da proteína da cápside viral (por exemplo, com um códon de parada âmbar), o domínio de dimerização pode incluir tanto um resíduo cisteína quanto uma seqüência de dimerização. Em alguns exemplos de realização, as cadeias pesadas da F(ab)2 dimeriza no domínio de dimerização não incluindo a região de dobradiça. O domínio de dimerização pode incluir uma seqüência de zíper de leucina (por exemplo, uma seqüência GCN4 como GRMKQLEDKVEELLSKNYHLENEVARLKKLVGERG (SEQ ID No: 3)).

Em alguns exemplos de realização, um polipeptídeo da invenção inclui ainda um domínio de cadeia constante de cadeia leve fundido a um domínio variável de cadeia leve, que em alguns exemplos de realização, inclui pelo menos um, dois ou três CDRs variantes. Em alguns exemplos de realização dos polipeptídeos da invenção, o polipeptídeo compreende um domínio constante da cadeia pesada fundido a um domínio variável de cadeia

pesada, que em alguns exemplos de realização inclui pelo menos um, dois ou três CDRs variantes.

Em alguns casos, pode ser preferível a mutação de um resíduo da região estrutural de modo que este seja variante no que diz respeito ao polipeptídeo de referência ou anticorpo fonte. Por exemplo, o resíduo da região estrutural 71 da cadeia pesada pode ser R, V ou A. Em outro exemplo, o resíduo da região estrutural 93 da cadeia pesada pode ser S ou A. Em outro exemplo ainda, o resíduo da região estrutural 94 é R, K ou T ou é codificada por *MRT*. Em outro exemplo, o resíduo da região estrutural 49 da cadeia pesada pode ser A ou G. Os resíduos da região estrutural da cadeia leve também podem ser mutados. Por exemplo, o aminoácido na posição 66 poderá ser R ou G.

Assim como descrito no presente, um CDR variante refere-se a um CDR com uma seqüência diferente comparada com o a seqüência de CDR correspondentes de um único polipeptídeo de referência / anticorpo fonte. Conseqüentemente, os CDRs de um único polipeptídeo da invenção podem, em certos exemplos de realização, corresponder ao conjunto de CDRs de um único polipeptídeo de referência ou anticorpo fonte. Os polipeptídeos da invenção podem incluir qualquer variante ou combinação de CDRs. Por exemplo, um polipeptídeo da invenção pode incluir uma variante de CDRH1 e um variante de CDRH2. Um polipeptídeo da invenção pode incluir um variante de CDRH1, variante de CDRH2 e um variante de CDRH3. Em outro exemplo, um polipeptídeo da invenção pode incluir uma variante de CDRH1, variante de CDRH2, variante de CDRH3 e a variante de CDRL3. Em outro exemplo, um polipeptídeo da invenção compreende um variante de CDRL1, variante de CDRL2 e a variante de CDRL3. Qualquer polipeptídeo da invenção pode constar de mais de um variante de CDRL3. Qualquer polipeptídeo da invenção pode constar de mais de um variante de CDRH3.

Em um exemplo de realização, um polipeptídeo da invenção compreende um ou mais seqüências variantes de CDR como ilustrado nas figuras 7, 19 e 22. Em um exemplo de realização, um polipeptídeo da invenção compreende uma ou mais seqüências variantes CDR, conforme ilustrado na Figura 11A. Em um exemplo de realização, um polipeptídeo da invenção compreende uma ou mais seqüências variantes de CDR, conforme ilustrado na Figura 15. Em outro exemplo de realização, um polipeptídeo da invenção compreende uma ou mais seqüências variantes de CDR como representado nas figuras 21A, 21B. Em outro exemplo de realização, um polipeptídeo da invenção compreende uma ou mais seqüências variantes de CDR, conforme ilustrado na Figura 24A.

Polipeptídeos da invenção podem ser complexados com um outro. Por exemplo, a invenção fornece um complexo de polipeptídeo constituído por dois polipeptídeos, onde cada polipeptídeo é um polipeptídeo da invenção, e no qual um dos polipeptídeos mencionados inclui pelo menos uma, duas ou todas variantes de CDRs H1, H2, H3, e o outro polipeptídeo compreende uma variante CDR da cadeia leve (por exemplo, CDR L3). Um complexo de polipeptídeos pode constar de um primeiro e um segundo polipeptídeo (no qual o primeiro e o segundo são polipeptídeos da invenção), no qual o primeiro polipeptídeo inclui pelo menos um, dois ou três variantes CDRs de cadeia leve, e o segundo polipeptídeo inclui pelo menos um, dois ou três variantes CDRs de cadeia pesada. A invenção também fornece complexos de polipeptídeos que compreendem das mesmas seqüências variantes de CDR. A formação de complexos pode ser mediada por qualquer técnica adequada, incluindo a dimerização/ multimerização em um domínio de dimerização/multimerização tal como as descritas no presente ou por interações covalentes (como, por exemplo, através de uma ponte de dissulfeto) (que em alguns contextos é parte do domínio de dimerização, por exemplo, um domínio de

dimerização pode conter uma seqüência de zíper de leucina e uma cisteína).

Em outro aspecto, a invenção fornece composições contendo polipeptídeos e/ou polinucleotídeos da invenção. Por exemplo, a invenção fornece uma composição que compreende uma variedade de qualquer um dos polipeptídeos da invenção descrita no presente. A variedade mencionada pode compreender de polipeptídeos codificada por uma variedade de polinucleotídeos gerados usando um conjunto de oligonucleotídeos compreendendo do enfraquecimento na seqüência que codifica um aminoácido variante, no qual o dito enfraquecimento das múltiplas seqüências de códons do conjunto de códons restrito que codificam o aminoácido variante. Uma composição que compreende de um polinucleotídeo ou polipeptídeo ou biblioteca da invenção pode ser sob a forma de um kit ou artigo manufaturado (opcionalmente embalados com as instruções, tampões, etc.).

Em um aspecto, a invenção fornece polinucleotídeos que codificam um polipeptídeo da invenção como descrito no presente. Em outro aspecto, a invenção fornece um vetor que compreende uma seqüência que codifica um polipeptídeo da invenção. O vetor pode ser, por exemplo, um vetor de expressão replicável (por exemplo, um vetor de expressão replicável pode ser um fago M13, fl, fd, Pf3 ou um derivado destes, ou um fago lambdóide, tal como lambda, 21, phi80, phi81, 82, 424, 434, etc. ou um derivado destes). O vetor pode constar de uma região promotora ligada à seqüência que codifica o polipeptídeo da invenção. O promotor pode ser apropriado para qualquer expressão do polipeptídeo, por exemplo, o sistema promotor lac Z, fosfatase alcalina promotor *pho* A (AP), o promotor de bacteriófago 1_{PL} (promotor sensível à temperatura), promotor tac, promotor de triptofano, promotor de bacteriófago T7. Assim, a invenção fornece também um vetor contendo um promotor selecionado a partir do grupo, constituído por promotores dos sistemas descritos anteriormente.

Os polipeptídeos da invenção podem ser exibidos sob qualquer forma adequada, de acordo com a necessidade e a vontade do profissional. Por exemplo, um polipeptídeo da invenção pode ser exibido em uma superfície viral, por exemplo, um fago ou partícula viral de fagomídeo. Assim, a invenção fornece partículas virais que compreendem um polipeptídeo da invenção e/ou polinucleotídicas que codificam um polipeptídeo da invenção.

Em um aspecto, a invenção fornece uma população que compreende uma variedade de polipeptídeo ou polinucleotídeos da invenção, onde cada tipo de polipeptídeo ou polinucleotídeo é um polipeptídeo ou polinucleotídeo da invenção como descrito no presente.

Em alguns exemplos de realização, os polipeptídeos e/ou polinucleotídeos são fornecidos como uma biblioteca, por exemplo, biblioteca que compreende uma variedade de, pelo menos, cerca de $1x10^4$, $1x10^5$, $1x10^6$, $1x10^7$, $1x10^8$ polipeptídeos e/polinucleotídeos ou seqüências da invenção distintas. Em outro aspecto, a invenção fornece também uma biblioteca que compreende uma variedade de vírus ou partículas virais da invenção, no qual cada vírus ou partícula viral exibe um polipeptídeo da invenção. A biblioteca da invenção pode incluir um vírus ou partículas virais para exibir qualquer número de polipeptídeos distintos (seqüências), por exemplo, no mínimo, cerca de $1x10^4$, $1x10^5$, $1x10^6$, $1x10^7$, $1x10^8$ polipeptídeos distintos.

Em outro aspecto, a invenção fornece células hospedeiras que possuem um polinucleotídeo ou vetor que compreende uma seqüência codifica um polipeptídeo da invenção.

Em outro aspecto, a invenção fornece métodos para a seleção de ligante de alta afinidade para antígenos alvo específicos. Em alguns desses exemplos de realização, o antígeno alvo específico inclui, mas não se limita a, HER2 ou DR5.

Os métodos da invenção fornecem populações de polipeptídeos

(por exemplo, bibliotecas de polipeptídeos (por exemplo, de domínios variáveis de anticorpos)) com um ou mais regiões CDR diversificadas. Essas bibliotecas são classificadas (selecionadas) e/ou rastreadas para identificar os ligantes de alta afinidade ao antígeno alvo. Em um aspecto, o polipeptídeo ligante da biblioteca é selecionado para se ligar ao antígeno alvo, e ter afinidade. O polipeptídeo ligante selecionado usando uma ou mais destas estratégias de seleção, pode ser então rastreado por afinidade e/ou especificidade (liga-se apenas ao antígeno alvo e não se liga ao outro antígeno).

Em um aspecto, um método da invenção compreende em gerar uma variedade de polipeptídeos com um ou mais regiões CDR diversificadas, classificando a variedade de polipeptídeos em ligantes a um antígeno alvo expondo a variedade de polipeptídeos a um antígeno alvo em condições adequadas para a ligação; separando os ligantes ao antígeno dos que não se ligam; isolando os ligantes, e identificando os ligantes com alta afinidade de ligação (ou qualquer ligante que possuí uma afinidade de ligação desejada). A afinidade dos ligantes que se ligam ao antígeno alvo pode ser determinada utilizando uma variedade de técnicas conhecidas na arte, por exemplo, a competição por ELISA, como descrito no presente. Opcionalmente, os polipeptídeos podem ser fundidos a um polipeptídeo marcado, tal como gD, poli His ou FLAG, que podem ser utilizados para classificar ligantes em combinação com a triagem para o antígeno alvo.

Outro exemplo de realização fornece um método de isolar ou selecionar um domínio variável de anticorpo que se liga a um antígeno alvo de uma biblioteca de domínios variáveis de anticorpos, no qual o dito método compreende em: a) expor uma população que compreende uma variedade de polipeptídeos imobilizados da invenção com um antígeno alvo em condições adequadas para ocorrer a ligação e isolar o polipeptídeo ligante no antígeno alvo; b) separar os "polipeptídeos ligantes" dos não ligantes, e eluir os ligantes

do antígeno alvo; c) repetir opcionalmente, as etapas a e b pelo menos uma vez (em alguns exemplos de realização, pelo menos duas vezes).

Em alguns exemplos de realização, um método pode adicionalmente compreender: d) incubar a subpopulação com uma concentração de antígeno alvo marcado em um intervalo de 0,1 nM a 1000 nM para formar uma mistura, sob condições adequadas para ligação; e) interagir a mistura com um agente imobilizado que se liga no antígeno alvo marcado; f) detectar a um ou mais polipeptídeos que ligam-se especificamente ao antígeno alvo marcado, e recuperar um ou mais polipeptídeos que liga-se especificamente ao antígeno alvo marcado do antígeno alvo marcado; e g) opcionalmente, repetir as etapas de (d) a (f) por pelo menos um vez (em alguns exemplos de realização, por pelo menos duas vezes), usando cada vez concentrações sucessivamente mais baixas de antígeno alvo marcado. Opcionalmente, o método pode compreender da adição de um excesso de antígeno alvo não marcado à mistura e incubando por um período suficiente para eluir ligantes de baixa afinidade do antígeno alvo marcado.

Em outro aspecto a invenção fornece um método para isolar ou selecionar ligantes de alta afinidade (ou possuindo uma afinidade de ligação desejada) para um antígeno alvo. Em um exemplo de realização, o dito método compreende: a) expor uma população que compreende uma variedade de polipeptídeos imobilizados da invenção com um antígeno alvo, no qual o antígeno é fornecido em uma quantidade de concentração em um intervalo de 0,1 nM a 1000 nM para isolar o polipeptídeo ligante ao antígeno alvo; b) separar os polipeptídeos ligantes do antígeno alvo; c) repetir opcionalmente, as etapas a e b pelo menos uma vez (em alguns exemplos de realização, pelo menos duas vezes), usando cada vez concentrações sucessivamente mais baixas de antígeno alvo marcado. d) selecionando o polipeptídeo ligante que se liga em concentrações mais baixas de antígeno alvo por alta afinidade (ou

qualquer afinidade desejada) pela incubação do polipeptídeo ligante com diferentes diluições do antígeno alvo e determinando o IC_{50} do polipeptídeo ligante, e; e) identificando um polipeptídeo ligante que tem uma afinidade desejada para o antígeno alvo. A afinidade pode ser dita, por exemplo, cerca de 0,1 nM a 200 nM, 0,5 nM a 150 nM, 1 nM a 100 nM e/ou 25 nM a 75 nM.

Outro exemplo de realização fornece um ensaio para isolar ou selecionar um polipeptídeo ligante compreendendo em: a) expor uma população que compreende uma variedade de polipeptídeos marcados da invenção com um antígeno alvo, no qual o antígeno é fornecido em uma quantidade de concentração em um intervalo de 0,1 nM a 1000 nM em condições adequadas para a ligação formar um complexo de polipeptídeo ligante e antígeno alvo marcado; b) isolar os complexos e separar o polipeptídeo ligante do antígeno alvo marcado; c) repetir opcionalmente as etapas a e b por pelo menos uma vez, utilizando a cada etapa uma concentração menor de antígeno alvo. Opcionalmente, o método pode ainda expor o complexo que compreende o polipeptídeo ligante e o antígeno alvo com um excesso de antígeno alvo não marcado. Em um exemplo de realização, as etapas do método são repetidas duas vezes e a concentração do antígeno alvo na primeira etapa de seleção está na faixa de 100 nM a 250 nM, e, na segunda etapa de seleção (quando realizada) está na faixa de 25 nM a 100 nM, e na terceira etapa de seleção (quando realizada) está na faixa de 0,1 nM a 25 nM.

A invenção inclui também um método para rastrear uma população que compreende uma variedade de polipeptídeos da invenção, no qual o dito método compreende em: a) incubar uma primeira amostra da população de polipeptídeos com um antígeno alvo em condições adequadas para a ligação dos polipeptídeos ao antígeno alvo b) sujeitar uma segunda amostra da população de polipeptídeos semelhante a uma incubação mas, na

ausência do antígeno alvo; (c) expor cada uma da primeira e segunda amostra com o antígeno alvo imobilizado em condições adequadas para a ligação dos polipeptídeos ao antígeno alvo imobilizado; d) detectar a quantidade de polipeptídeos ligados ao antígeno alvo imobilizado em cada amostra, e) determinar afinidade de ligação de um polipeptídeo específico para o antígeno alvo calculando a relação entre a quantidade de polipeptídeo específico que se ligou na primeira amostra sobre a quantidade de polipeptídeo específico que se ligou na segunda amostra.

As bibliotecas geradas como descrito no presente também podem ser rastreadas para se ligarem a um alvo específico e por ausência de ligação a um antígeno não alvo. Em um aspecto, a invenção fornece um método para rastrear um polipeptídeo, tal como um domínio variável de anticorpo da invenção, que se liga a um antígeno alvo específico de uma biblioteca de domínios variáveis de anticorpos, no qual o dito método compreende em: a) gerar uma população compreendendo uma variedade de polipeptídeos da invenção; b) expor a população de polipeptídeos à um antígeno alvo em condições adequadas para a ligação; c) separar o polipeptídeo ligante na biblioteca dos polipeptídeos não ligantes; d) identificar um polipeptídeo ligante específico para o antígeno alvo pela determinação se o polipeptídeo ligante se liga a um antígeno que não seja o antígeno alvo e; e) isolar um polipeptídeo ligante específico para o antígeno alvo. Em alguns exemplos de realização, a etapa (e) compreende na eluição dos polipeptídeos classificados a partir do antígeno alvo, e amplificação de um vetor de expressão replicável que codifica o dito polipeptídeo ligante. Em alguns exemplos de realização, uma ou mais bibliotecas, clones ou polipeptídeos são rastreados contra um painel de antígenos incluindo o antígeno alvo. Em alguns exemplos de realização, os clones ou polipeptídeos que ligam especificamente ao antígeno alvo e não substancialmente reagem cruzadamente com qualquer um dos outros antígenos no painel são selecionados. O painel de

antígenos pode incluir no mínimo, três e no máximo 100 antígenos diferentes. Em alguns casos, o painel de antígenos inclui de 3 a 100, de 3 a 50, de 3 a 25, ou de 3 a 10 antígenos diferentes.

Combinações de um dos métodos de triagem/ seleção descritos acima podem ser realizadas com os métodos de rastreio. Por exemplo, em um exemplo de realização, os polipeptídeos ligantes são selecionados primeiramente pela ligação a um antígeno alvo imobilizado. Os polipeptídeos ligantes que se ligam ao antígeno alvo imobilizado podem então ser rastreados pela ligação ao antígeno e pela ausência de ligação a um antígeno que não é o antígeno alvo. Os polipeptídeos ligantes que se ligam especificamente ao antígeno alvo podem ser amplificados, quando necessário. Estes polipeptídeos ligantes podem ser selecionados para uma maior afinidade pela exposição com uma concentração de antígenos alvo marcados para formar um complexo, no qual a concentração de antígeno alvo marcado é de cerca de 0,1 nM a cerca de 1000 nM, e os complexos são isolados pela exposição com um agente que se liga ao marcador sobre o antígeno alvo. Um polipeptídeo ligante pode então ser eluído do antígeno alvo marcado e opcionalmente, as etapas de seleção são repetidas, e a cada etapa é utilizado uma concentração menor de antígeno alvo marcado. O polipeptídeo ligante que pode ser isolado utilizando este método de seleção pode então ser rastreado pela alta afinidade utilizando, por exemplo, um ensaio de ELISA na solução fase, tal como descrito, por exemplo, nos exemplos 2 e 4 ou outros métodos convencionais conhecidos no estado da técnica. As populações de polipeptídeos da invenção utilizados nos métodos da invenção podem ser prestadas sob qualquer forma adequada de etapas de seleção / rastreio. Por exemplo, os polipeptídeos podem estar livres, na forma solúvel, anexados a uma matriz, ou presentes na superfície de uma partícula viral como fago ou partícula de fagomídeo. Em alguns exemplos de realização dos métodos da invenção, a variedade de polipeptídeos é codificada por uma variedade de vetores

replicáveis fornecidas sob a forma de uma biblioteca. Nos métodos de seleção / triagem descritos no presente, vetores codificando polipeptídeos ligantes podem ser ainda mais amplificados para fornecer quantidades suficientes de polipeptídeo para uso em repetições das etapas de seleção / triagem (que, como indicado acima, são opcionais nos métodos da invenção).

Em um exemplo de realização, a invenção fornece um método de seleção para um polipeptídeo que se liga a um antígeno alvo compreendendo:

a) gerar uma composição que compreende uma variedade de polipeptídeos da invenção, como descrito no presente;

b) selecionar um polipeptídeo ligante que se liga a um antígeno alvo a partir da composição;

c) isolar o polipeptídeo ligante dos polipeptídeos não ligantes;

d) identificar os ligantes de afinidade desejada a partir dos polipeptídeos ligantes isolados.

Em outro exemplo de realização, a invenção fornece um método de seleção para um domínio variável ligante a um antígeno que se liga a um antígeno alvo de uma biblioteca de domínios variáveis de anticorpos compreendendo:

a) expor a biblioteca de domínios variáveis de anticorpos da invenção (conforme descrito no presente) a um antígeno alvo;

b) separar os ligantes dos não ligantes, e eluir os ligantes a partir do antígeno alvo e incubar os ligantes em uma solução com a quantidades decrescentes de antígeno alvo em uma concentração de cerca de 0,1 nM a 1000 nM;

c) selecionar os ligantes que podem se ligar a baixas concentrações de antígeno alvo e que possuem uma afinidade de cerca de 0,1 nM a 200 nM.

Em alguns exemplos de realização, a concentração do antígeno

alvo é de cerca de 100 a 250 nM, ou cerca de 25 a 100 nM.

Em um exemplo de realização, a invenção fornece um método de seleção para um polipeptídeo que se liga a um antígeno alvo a partir de uma biblioteca de polipeptídeos compreendendo:

a) isolar o polipeptídeo ligante para um antígeno alvo, expondo uma biblioteca que consta de uma variedade de polipeptídeos do invento (conforme descrito no presente) com um antígeno alvo imobilizado em condições adequadas para a ligação;

b) separar os polipeptídeos ligantes ao antígeno alvo dos polipeptídeos não ligantes e eluir os polipeptídeos ligantes ao antígeno alvo para obter uma subpopulação enriquecida de ligantes, e

c) repetir opcionalmente as etapas a e b, pelo menos uma vez (em alguns exemplos de realização, pelo menos duas vezes), cada repetição utilizando a subpopulação de ligantes obtidos a partir da última etapa de seleção.

Em alguns exemplos de realização, o método da invenção pode adicionalmente compreender:

d) incubar a subpopulação do polipeptídeo ligante com uma concentração de antígeno alvo marcado em um intervalo de 0,1 nM a 1000 nM, sob condições adequadas para ligação para formar uma mistura;

e) interagir a mistura com um agente imobilizado que se liga no antígeno alvo marcado;

f) detectar o polipeptídeo ligante que se liga especificamente ao antígeno alvo marcado e eluir o polipeptídeo ligante do antígeno alvo marcado; e

g) repetir opcionalmente as etapas de (d) a (f) por pelo menos um vez (em alguns exemplos de realização, por pelo menos duas vezes), cada repetição utilizando a subpopulação de ligante obtido na etapa de seleção anterior e usando concentrações cada vez mais baixas de antígeno alvo

marcado do que na etapa anterior.

Em alguns exemplos de realização, estes métodos compreendem adicionalmente da adição de um excesso de antígeno alvo não marcado na mistura e da incubação por um período de tempo suficiente para eluir ligantes de baixa afinidade a partir do antígeno alvo marcado. Em outro exemplo de realização, a invenção fornece um método para isolar ligantes de alta afinidade para o antígeno alvo compreendendo:

a) expor uma biblioteca que compreende uma variedade de polipeptídeos da invenção (como descrito no presente) com um antígeno alvo em uma concentração de 0,1 nM a 1000 nM para isolar o polipeptídeo ligante ao antígeno alvo;

b) separar os polipeptídeos ligantes do antígeno alvo para se obter uma subpopulação enriquecida de polipeptídeo ligante; e

c) repetir opcionalmente, as etapas a e b pelo menos uma vez (em alguns exemplos de realização, pelo menos duas vezes), usando cada vez concentrações sucessivamente mais baixas de antígeno alvo marcado em relação à etapa anterior para isolar o polipeptídeo ligante que se liga em concentrações mais baixa ao antígeno alvo.

Em um aspecto, a invenção fornece um ensaio de seleção do polipeptídeo ligante a partir de uma biblioteca que consta de uma variedade de polipeptídeos do invento (conforme descrito no presente) compreendendo:

a) expor uma biblioteca com uma concentração de antígeno alvo marcado em uma concentração de 0,1 nM a 1000 nM sob condições ideais para ocorrer a ligação e formar um complexo com um polipeptídeo ligante e o antígeno alvo marcado;

(b) isolar os complexos e separar os polipeptídeos ligantes do antígeno alvo marcado para se obter uma subpopulação enriquecida de ligantes; e

(c) opcionalmente repetir as etapas (a) e (b) pelo menos uma vez (em alguns exemplos de realização, pelo menos duas vezes), cada repetição usando a subpopulação de ligantes obtida a partir da última etapa de seleção e usando uma concentração decrescente de antígeno alvo que foi utilizada na etapa anterior.

Em alguns exemplos de realização, o método compreende adicionalmente da adição de um excesso de antígeno alvo não marcado ao complexo de polipeptídeo e antígeno alvo Em alguns exemplos de realização, as etapas estabelecidas acima são repetidas pelo menos uma vez (em alguns exemplos de realização, pelo menos duas vezes) e a concentração do antígeno alvo na primeira etapa de seleção está na faixa de 100 nM a 250 nM, e, na segunda etapa de seleção está na faixa de 25 nM a 100 nM, e na terceira etapa de seleção está na faixa de 0,1 nM a 25 nM.

Em outro aspecto, a invenção fornece também um método para rastrear uma biblioteca que compreende uma variedade de polipeptídeos da invenção, no qual o dito método compreende em:

a) incubar uma primeira amostra da biblioteca com uma concentração de antígeno alvo em condições adequadas para a ligação dos polipeptídeos ao antígeno alvo

b) incubar uma segunda amostra da biblioteca na ausência do antígeno alvo;

(c) expor cada uma da primeira e segunda amostra com o antígeno alvo imobilizado em condições adequadas para a ligação dos polipeptídeos ao antígeno alvo imobilizado;

d) detectar a ligação do polipeptídeo ao antígeno alvo imobilizado em cada amostra,

e) determinar afinidade de ligação de um polipeptídeo específico para o antígeno alvo calculando a relação entre a quantidade de polipeptídeo

específico que se ligou na primeira amostra sobre a quantidade de polipeptídeo específico que se ligou na segunda amostra.

O uso diagnóstico e o uso terapêutico dos polipeptídeos ligantes da invenção são contemplados. Em um pedido diagnóstico, a invenção fornece um método para determinar a presença de uma proteína de interesse compreendendo na exposição de uma amostra suspeita de conter a proteína à um polipeptídeo ligante da invenção e determinando a ligação do polipeptídeo ligante na amostra. Para este uso, a invenção fornece um kit que inclui os polipeptídeos ligantes e instruções para a utilização dos polipeptídeos ligantes para detectar a proteína.

A invenção prevê ainda: ácidos nucléicos isolados que codificam o polipeptídeo ligante; um vetor que possuí ácidos nucléicos, opcionalmente, uma seqüência controle ligada operacionalmente, reconhecida por uma célula hospedeira transformada com o vetor; uma célula hospedeira transformada com o vetor, um processo de produção do polipeptídeo ligante compreendendo no cultivo desta célula hospedeira, a fim de que o ácido nucléico seja expresso e, opcionalmente, recuperando o polipeptídeo ligante da cultura de células hospedeiras (por exemplo, a partir do meio de cultura da célula hospedeira).

A invenção fornece também uma composição que inclui um polipeptídeo ligante da invenção e um veículo (por exemplo, um veículo farmaceuticamente aceitável) ou diluente. Esta composição para uso terapêutico é estéril e pode ser liofilizada. Também é contemplado o uso do polipeptídeo ligante da presente invenção na fabricação de um medicamento para tratar uma indicação descrita no presente. A composição pode constar adicionalmente de um segundo agente terapêutico como um agente quimioterápico, um agente citotóxico ou um agente anti-angiogênico.

A invenção fornece ainda um método para tratar um mamífero, compreendendo a adminstração de uma quantidade eficaz do polipeptídeo

ligante da invenção para o mamífero. O mamífero a ser tratado no método pode ser um mamífero não humano, por exemplo, um primata ou roedor adequados para a obtenção de dados pré-clínicos (por exemplo, camundongo, rato ou coelho). Os mamíferos não humanos podem ser saudáveis (por exemplo, nos estudos toxicológicos), ou podem estar sofrendo de uma doença a ser tratada com o polipeptídeo ligante de interesse. Em um exemplo de realização, o mamífero está sofrendo de um transtorno relacionado com DR5. Em outro exemplo de realização, o mamífero está sofrendo de um transtorno relacionado com HER2.

Em um exemplo de realização, o mamífero está sofrendo ou corre o risco de desenvolver angiogênese anormal (por exemplo, angiogênese patológica). Em um exemplo de realização específico, o distúrbio é um câncer selecionado a partir do grupo composto por câncer colorretal, carcinoma de células renais, câncer de ovário, câncer de pulmão de não-pequenas células (NSCLC), carcinoma broncoalveolar e câncer pancreático. Em outro exemplo de realização, o distúrbio é uma doença causada pela neovascularização ocular, por exemplo, cegueira diabética, retinopatias, principalmente retinopatia diabética, degeneração macular induzida pela idade e rubeose. Em outro exemplo de realização, o mamífero a ser tratado está sofrendo ou corre o risco de desenvolver um edema (por exemplo, um edema associado com tumores cerebrais, edema associado a um acidente vascular cerebral, ou um edema cerebral). Em outro exemplo de realização, o mamífero está sofrendo de, ou corre o risco de desenvolver um transtorno ou doença selecionada a partir do grupo composto por artrite reumatóide, doença inflamatória intestinal, ascite refratária, psoríase, sarcoidose, arteriosclerose arterial, sepse, queimaduras e pancreatite. De acordo com outro exemplo de realização, o mamífero está sofrendo ou corre o risco de desenvolver uma doença genito-urinaria selecionada a partir do grupo constituído por doença do ovário policístico (PI),

endometriose e fibrose uterina. Em um exemplo de realização, o distúrbio é uma doença causada pela não regulação da sobrevivência celular (por exemplo, quantidade anormal de morte celular), incluindo, mas não se limitado a, câncer, doenças do sistema imunológico, distúrbios do sistema nervoso e distúrbios do sistema vascular. A quantidade de polipeptídeo ligante da invenção é que irá ser administrada é uma quantidade terapeuticamente eficaz para tratar um distúrbio. Nos estudos de seleção d e dose, uma variedade de doses do polipeptídeo ligante pode ser administrada para o mamífero. Em outro exemplo de realização, a quantidade terapeuticamente eficaz de polipeptídeo ligante é administrada a um paciente humano para tratar um distúrbio no paciente.

Em um exemplo de realização, os polipeptídeos ligantes desta invenção úteis para tratar tumores, tumores malignos e outros distúrbios relacionados com a angiogênese anormal, incluindo distúrbios inflamatórios ou desordens imunológicas e/ou diabetes ou outras doenças relacionadas com a insulina descritas no presente são anticorpos Fab ou scFv. Portanto, esses polipeptídeos ligantes podem ser utilizados na fabricação de um medicamento para tratar uma doença inflamatória ou doença imune. Um mamífero que está sofre ou corre o risco de desenvolver um distúrbio ou doença descrita no presente pode ser tratado pela administração, de um segundo um agente terapêutico, simultaneamente, seqüencialmente ou em combinação com um polipeptídeo (por exemplo, um anticorpo) da presente invenção. Deve-se compreendido que outros agentes terapêuticos, além do segundo agente terapêutico, pode ser administrado ao mamífero ou utilizado na fabricação de um medicamento para a indicação desejada.

Estes polipeptídeos podem ser utilizados para se compreender o papel da colaboração da célula hospedeira estromal no crescimento de tumores não hospedeiro implantado, tal como em modelos de camundongos no

qual tumores humanos foram implantados. Estes polipeptídeos podem ser utilizados em métodos para a identificação de tumores humanos que podem escapar do tratamento terapêutico ou pelo acompanhamento ou observação do crescimento do tumor implantado em um roedor ou coelho após o tratamento com o polipeptídeo desta invenção. Os polipeptídeos desta invenção também podem ser utilizados para estudar e avaliar a combinação de terapias com um polipeptídeo esta invenção e outros agentes terapêuticos. Os polipeptídeos desta invenção podem ser utilizados para estudar o papel de uma molécula alvo de interesse em outras doenças pela administração dos polipeptídeos a um animal que sofre da doença ou doença similar e determinando assim se um ou mais sintomas da doença são atenuadas.

Por uma questão de clareza, na descrição do presente, a menos que especificado ou contextualmente indicado de outra forma, todos as numerações de aminoácidos estão de acordo com Kabat *et al.* (vide elaboração adicional em "Definições" abaixo).

BREVE DESCRIÇÃO DAS FIGURAS

A Figura 1 exibe as seqüências de um domínio de cadeia leve e cadeia pesada 4D5 (SEQ ID No: I & 2, respectivamente).

A Figura 2 exibe um modelo 3-D da estrutura do 4D5 humanizado mostrando os resíduos CDR que formam sombras contíguas. Sombras contíguas são formadas por resíduos de aminoácidos 28, 29, 30, 31 e 32 no CDRL1; resíduos de aminoácidos 50 e 53 do CDRL2; resíduos de aminoácido 91, 92, 93, 94 e 96 do CDRL3; resíduos de aminoácido 28, 30, 31, 32,33, no CDRH1; e resíduos de aminoácido 50, 52, 53, 54, 56 e 58 no CDRH2.

A Figura 3 exibe a freqüência de aminoácidos (identificada pelo código de letra única), nas seqüências CDR da cadeia leve do anticorpo humano do banco de dados de Kabat. A freqüência de cada aminoácido em uma determinada posição de aminoácido é exibida começando com o

aminoácido mais freqüente na posição a esquerda e continuando para a direita para os aminoácidos menos freqüentes. O número abaixo do aminoácido representa o número de seqüências que ocorrem naturalmente no banco de dados Kabat que têm aquele aminoácido nessa posição.

A Figura 4 exibe a freqüência de aminoácidos (identificada pelo código de letra única), nas seqüências CDR da cadeia pesada do anticorpo humano do banco de dados de Kabat. A freqüência de cada aminoácido em uma determinada posição de aminoácido é exibida começando com o aminoácido mais freqüente na posição a esquerda e continuando para a direita para os aminoácidos menos freqüentes. O número abaixo do aminoácido representa o número de seqüências que ocorrem naturalmente no banco de dados Kabat que têm aquele aminoácido nessa posição. As posições dos aminoácidos na região estrutural 71, 93 e 94 também são exibidas.

A Figura 5 ilustra esquematicamente um vetor bicistrônico permitindo a expressão de transcrições separadas para a exibição de $F(ab)_2$. Um promotor adequado direciona a expressão de um primeiro e segundo *cístron*. O primeiro cístron codifica uma seqüencia de sinal de secreção (*malE* ou *stII*), um domínio variável e constante de cadeia leve e um marcador gD. O segundo cístron codifica uma seqüência de sinal de secreção, uma seqüência que codifica um domínio 1 constante e variável da cadeia pesada (CH1) e um domínio de dimerização de cisteína e, pelo menos, uma parte da proteína da cápside viral.

Figura 6 exibe as seqüências da região estrutural das cadeias leve e pesada do huMAb4D5-8. Os números em sobrescrito/negrito indicam as posições dos aminoácidos de acordo com a numeração de Kabat.

A Figura 7 exibe modificações/variações nas seqüências da região estrutural das cadeias leve e pesada do huMAb4D5-8. Os números em sobrescrito/negrito indicam as posições dos aminoácidos de acordo com a

numeração de Kabat.

A Figura 8 ilustra o esquema de aleatorização para cada posição CDR diversificada nas bibliotecas YSGR-A, YSGR-B, YSGR-C e YSGR-D, como descrito no Exemplo 1.

As Figuras 9A-9D mostram os oligonucleotídeos mutagênicos utilizados na construção das bibliotecas YSGR-A, YSGR-B, YSGR-C, YSGR-D, como descrito no Exemplo 3. O DNA enfraquecido equimolar estão representados no conjunto de códons (W = A/T, K=G/T, M=A/C, N=A/C/G/T, R=A/G, S=G/C, Y=T/C). O conjunto de códons são representados no código RJB. A notação "XXX" nos oligonucleotídeos H3-A6-H3-A17 representa códons de codificação de Tyr/Ser/Gly em uma razão molar de 50/25/25, respectivamente. A notação "XXX" nos oligonucleotídeos H3-B6-H3-B17 representa códons de codificação Tyr/Ser/Arg em uma razão molar de 25/50/25, respectivamente. A notação "XXX" nos oligonucleotídeos H3-C6-H3-C17 representa códons de codificação de Tyr/Ser/Gly/Arg em uma razão molar de 38/25/25/12, respectivamente. A notação "XXX" nos oligonucleotídeos H3-D6-H3 a D17 representa códons de codificação Tyr/Ser/Gly/Arg/Ala/Asp/Glu/Phe/His/Ile/Lys/Leu/Met/Asn/Pro/Gln/Thr/Val/Trp em uma razão molar de 20/26/26/13/1/1/1/1/1/1/1/1/1/1/1/1/1/1/1/1, respectivamente.

A Figura 10 mostra a razão de enriquecimento para a biblioteca YSGR-A-D após 5 etapas de seleção contra o DR5 humano ou HER-2 humano, tal como descrito no Exemplo 2. Os números são mostrados como X/Y, no qual X representa o número de clones únicos e Y representa o número de clones que se ligam especificamente ao DR5 humano ou HER-2 humano. Clones específicos são identificados como aqueles que apresentam uma ligação ao DR5 humano ou HER-2 humano, pelo menos, dez vezes maior (baseado no sinal de ELISA em leitura a 450nm) do que a ligação a albumina

do soro bovino (BSA).

A Figura 11A exibe as seqüências de CDRH1, CDRH2, CDRH3 e CDRL3 para 106 clones que se ligam ao HER-2 humano. A Figura 11B exibe os resultados do ensaio de ELISA para cada um dos clones estabelecidos na Figura 11A. Números em negrito indicam uma ligação forte (sinal de 2 a 10).

A Figura 12 exibe as seqüências de aminoácidos para CDRL3, CDRH1, CDRH2 e CDRH3 de ligantes específicos para o HER-2 humano com regiões isoladas curtas (por exemplo, 6-7 resíduos) de CDRH3 da biblioteca YSGR-A-D, tal como descrito no Exemplo 2. As seqüências consenso são exibidas para CDRL3, CDRH1, e CDRH2. (Os números dos clones correspondem aos indicados na figura 11.)

A Figura 13 exibe as seqüências de aminoácidos para CDRH1, CDRH2, e CDRH3 de ligantes específicos para HER-2 humanos com um CDRH3 tendo 8 aminoácidos isolados da biblioteca YSGR-A-D tal como descrito no Exemplo 2. As seqüências consenso são exibidas para CDRH1, CDRH2 e CDRH3. (Os números dos clones de 1-19 correspondem aos indicados na figura 11 da seguinte forma: 17, 97, 18, 19, 98, 99, 100, 20, 21, 22, 23, 24, 101, 102, 25, 103,26, 27 e 28, respectivamente.)

Figura 14 mostra as seqüências de aminoácidos para CDRH1, CDRH2 e CDRH3 a partir dos ligantes específicos para HER-2 humano com regiões de comprimento médio de CDRH3 (por exemplo, cerca de 12-14 aminoácidos) isolados das bibliotecas YSGR-A-D, tal como descrito no Exemplo 2 . As seqüências consenso são exibidas para CDRH1, CDRH2, e CDRH3. As seqüências consenso são exibidas para CDRH3 pela transferência de algumas das seqüências CDRH3 ao longo de dois aminoácidos, de modo a que a seqüência CDRH3 começa na posição 97 em vez da posição 95.

A Figura 15 exibe as seqüências de CDRL3, CDRH1, CDRH2 e CDRH3 de ligantes de DR5 humano, e o IC_{50} de alguns ligantes de DR5 humano.

A Figura 16 exibe as seqüências de aminoácidos CDRL3, CDRH1, CDRH2 e CDRH3 a partir dos ligantes específicos para DR5 humano isolado a partir das bibliotecas YSGR-A-D biblioteca, tal como descrito no Exemplo 2. O IC_{50} dos clones par a ligação ao DR5 humano são exibidos. Os clones que reagem cruzadamente com o DR5 murino também são identificados. As seqüências consenso são exibidas para CDRL3, CDRH1, CDRH2 e CDRH3. (Os números dos clones de 1-11 correspondem aos números dos clones 10, 11, 12, 8, 7, 13, 5, 9, 6, 15 e 14 da figura 15.)

A Figura 17 exibe a curva de ligação dos ligantes específicos para o DR5 humano isolado a partir da biblioteca YSGR-A-D. Alguns dos ligantes específicos também se ligam ao DR-5 murino.

A Figura 18 exibe um modelo 3D que ilustra o ligante Apo-2L, O anticorpo e o anticorpo BFD1 se ligam ao receptor DR5. A região de ligação dos anticorpos se sobrepõe um ao outro. O sítio de ligação destes anticorpos são distintos da maior parte dos resíduos do sítio de ligação do ligante Apo-2L.

As Figuras 19A e 19B ilustram o esquema de aleatorização para cada posição CDR diversificada nas bibliotecas Binárias H3 (SAH3, SCH3, SFH3, SGH3, SIH3, SLH3, SNH3, SPH3, SRH3, STH3, SWH3 e SYH3), como descrito no Exemplo 4. As posições de aminoácidos indicadas são numeradas de acordo com a numeração de Kabat.

As Figuras 20A-20L exibem os oligonucleotídeos mutagênicos utilizados na construção das bibliotecas Binárias H3 (SAH3 (Fig. 20A), SCH3 (Fig. 20B), SFH3 (Fig. 20C), SGH3 (Fig. 20D), a SIH3 (Fig. 20E), SLH3 (Fig. 20F), SNH3 (Fig. 20G), SPH3 (Fig. 20H), SRH3 (Fig. 201), STH3 (Fig. 20J), SWH3 (Fig. 20K), e SYH3 (Fig. 20L)), Como descrito no Exemplo 4 (SEQ ID Nos :618-788). A degenerescência equimolar do DNA são representadas nos conjuntos de códons (W=A/T, K=G/T, M=A/C, N=A/C/G/T, R=A/G, S=G/C, Y=T/C). Os conjuntos de códons são representados no código IUB.

Figura 21A exibe as seqüências de aminoácidos CDRL3, CDRH1, CDRH2, e CDRH3 dos ligantes específicos para HER2 isolados a partir do *pool* de bibliotecas binárias H3 (SXH3), como descrito no Exemplo 5 (SEQ ID Nos: 789-896). A Figura 21B exibe os resultados dos testes de ELISA para cada um dos clones estabelecidos na figura 21A. O sombreamento escuro indica um forte caráter de ligação (sinal de 2 a 10).

A Figura 22A ilustra o esquema de aleatorização para cada posição CDR diversificada nas bibliotecas Binárias de superfície (SY, SW e SF), como descrito no Exemplo 6. As posições de aminoácidos indicadas são numeradas de acordo com a numeração de Kabat.

A Figura 23 exibe os oligonucleotídeos mutagênicos utilizados na construção das bibliotecas Binárias de superfície (SY, SW e SF), como descrito no Exemplo 6 (SEQ ID Nos: 1005-1013). A degenerescência equimolar do DNA são representadas nos conjuntos de códons (W=A/T, K=G/T, M=A/C, N=A/C/G/T, R=A/G, S=G/C, Y=T/C). Os conjuntos de códons são representados no código IUB.

Figura 24A exibe as seqüências de aminoácidos CDRL3, CDRH1, CDRH2, e CDRH3 a partir de ligantes específicos de HER2 isolados de um *pool* de bibliotecas Binárias de superfície (SX-superfície), como descrito no Exemplo 8 (SEQ ID Nos: 897-1004). A Figura 24B exibe os resultados dos testes de ELISA para cada um dos clones ilustrados na figura 24A. O sombreamento escuro indica um forte caráter de ligação (sinal de 2 a 10), O sombreamento claro indica fraca ligação (sinal de 0,25 a 2).

A Figura 25 representa graficamente a especificidade das Fabs contendo diferentes combinações binárias de aminoácidos (Ser:Tyr, Ser:Trp, Ser:Arg ou Ser:Phe) obtidas no presente a partir da biblioteca binária SXH3 ou biblioteca binária SX-superfície.

As Figuras 26A e 26B exibem a análises de ressonância por

superfície plasmônica de ligações a partir de proteínas solúveis Fab de três clones de ligantes de HER2 (Clone B1L, clone G54 e clone YSGR-A-42) para a HER2 imobilizada. O clone B1L teve um k_a de 1,9 x 10^6 M^{-1} S^{-1}, um k_d de 1,7 x 10^{-3} S^{-1} e um K_D de 890 nM. O clone G54 teve um k_a de 2,0 x 10^5 M^{-1} S^{-1}, um k_d de 2,2 x 10^{-3} S^{-1} e um K_D de 11 nM. O clone YSGR-A-42 teve um k_a de 2,7 x 10^6 $M^{-1}S^{-1}$, um K_d de 1,5 x 10^{-3} s^{-1}, e um K_D de 570 pM.

A Figura 27 exibe os resultados das análises por citometria de fluxo da ligação dos Fabs anti-HER2 isolados de cada uma das bibliotecas YSGR (clone A-42), SX-superfície (clones G37 e G54), e SXH3 (clone B1L) para células NR6 ou H2NR6-4D5, tal como descrito no Exemplo 7.

Figura 28 exibe as seqüências para CDRH1, CDRH2, CDRH3 e CDRL3 para cada um dos IgGs ligantes de HER2 B1l, G37, G54, YSGR-A-42, YSGR-A-27, B27, G43 e YSGR-D-104. A Figura 28 também mostra os valores da IC_{50} para a versão Fab de cada clone.

A Figura 29 exibe os resultados dos ensaios de ligação por competição descritos no Exemplo 7 para determinar a capacidade de cada um dos IgGs específicos para HER-2 indicados de competir para a ligação ao HER2 com *Omnitarg*, *Herceptin* e cada um dos outros IgGs.

MODOS DE CONDUÇÃO DA INVENÇÃO

A invenção fornece novos, métodos não convencionais, muito simplificados e flexíveis para diversificar seqüências CDR (incluindo seqüências de domínio variável de anticorpos) e bibliotecas que compreendem uma multiplicidade e geralmente uma grande multiplicidade de CDRs diversificados (incluindo seqüências de domínio variável de anticorpos). Tais bibliotecas fornecem bibliotecas combinatórias úteis para, por exemplo, selecionar e/ou rastrear clones de anticorpos sintéticos com atividades desejáveis tais como, afinidade de ligação e afinidade de avidade. Estas bibliotecas são úteis para a identificação de seqüências polipeptídicas de

imunoglobulinas que são capazes de interagir com qualquer um de uma ampla variedade de antígenos alvo. Por exemplo, muitas bibliotecas compreendendo polipeptídeos da imunoglobulina da invenção, expressa em exibição por fagos é particularmente útil para, e fornecer uma produção elevada, eficiente e em sistemas automatizados, de seleção e/ou rastreio de moléculas ligantes ao antígeno de interesse. Os métodos da invenção são concebidos para fornecer ligantes de alta afinidade aos antígenos alvos com alterações mínimas para uma molécula fonte ou modelo e fornece um bom rendimento de produção quando o anticorpo ou fragmento ligante ao antígeno são produzidos em cultura de células.

Os Métodos e composições da invenção fornecem inúmeras vantagens adicionais. Por exemplo, seqüências variantes de CDR relativamente simples podem ser gerados, usando a um conjunto de códons que codifica um número restrito de aminoácidos (ao contrário da abordagem convencional de utiliza um conjunto de códons para codificar o número máximo de aminoácidos), apesar de manter diversidade suficiente de uma única seqüência de ligação ao alvo. A natureza simplificada (e em geral relativamente de menor dimensão) das seqüências geradas de acordo com a invenção permite uma diversificação adicional em uma população ou subpopulação desta, que foi identificada por possuir as características desejadas.

A natureza simplificada das seqüências dos ligantes para o antígeno alvo obtidos pelos métodos da invenção deixa um espaço significativamente maior para modificações adicionais nas seqüências e assim alcançar os resultados desejados. Por exemplo, a seqüência dessas modificações é realizada rotineiramente por métodos de maturação por afinidade, humanização e etc. Pela diversificação baseada em um conjunto de códons restrito que codificam apenas um número limitado de aminoácidos, torna-se possível atingir diferentes epítopos utilizando diferentes conjuntos de

códons restritos, proporcionando, assim, ao técnico do assunto um maior controle da diversificação, em comparação com procedimentos de aleatorização baseadas em um número máximo de aminoácidos. Outra vantagem em utilizar um conjunto de códons restrito é que podem ser eliminados aminoácidos indesejáveis, por exemplo, a metionina ou códons de parada, melhorando assim a qualidade total e a produtividade da biblioteca. Além disso, em alguns casos, pode ser desejável limitar a diversidade conformacional dos ligantes potenciais. Métodos e composições da invenção proporcionam a flexibilidade necessária para se atingir este objetivo. Por exemplo, a presença de determinados aminoácidos, tais como a tirosina, em uma seqüência resulta em menos conformações rotacionais.

DEFINIÇÕES

Os aminoácidos são representados neste documento tanto como pelo código de uma letra como pelo código de três letras ou ambos.

O termo "purificação por afinidade" descreve a purificação de uma molécula baseada na atração específica ou ligação da molécula a uma substância química ou parceiro de ligação para formar uma combinação ou complexo que permite com que a molécula seja separada das impurezas, permanecendo ligada ou atraída a molécula de ligação.

O termo “anticorpo” é utilizado no sentido mais amplo e inclui especificamente anticorpos monoclonais (incluindo anticorpos antagonistas e agonistas), composições de anticorpos com especificidade poliepitópica, anticorpos maturados por afinidade, anticorpos humanizados, anticorpos quiméricos bem como fragmentos ligantes a antígenos, por exemplo, Fab, $F(ab')_2$, scFv e Fv, desde que exibam a atividade biológica desejada. Em um exemplo de realização, o termo "anticorpos" inclui também os anticorpos humanos. Como utilizado no presente, "domínio variável de anticorpo" refere-se às porções de cadeias leves e pesadas de moléculas de anticorpos que

incluem seqüências de aminoácidos de regiões de determinação de complementaridade (CDR, por exemplo, CDR1, CDR2 e CDR3), e regiões denominadas regiões estruturais (FR). V_H refere-se ao domínio variável da cadeia pesada. V_L refere-se ao domínio variável da cadeia leve. De acordo com as composições e os métodos utilizados na presente invenção, as posições de aminoácido atribuídas aos CDRs e FRs pode ser definidas de acordo com Kabat (*Sequences of Proteins of Immunological Interest* (*National Institutes of Health*, Bethesda, 1987 e 1991)). A numeração dos aminoácidos de anticorpos ou fragmentos de anticorpos ligantes de antígenos também é numerada de acordo com a numeração de Kabat.

Como utilizado no presente, o termo "região de determinação de complementaridade" (CDRs; ou seja, CDR1, CDR2, e CDR3) refere-se a presença de resíduos de aminoácido um domínio variável de anticorpo que são necessários para a ligação ao antígeno. Cada domínio variável tipicamente tem três regiões CDR identificadas como CDR1, CDR2 e CDR3. Cada região de determinação de complementaridade pode constar de resíduos de aminoácidos de uma "região de determinação de complementaridade" como definido por Kabat (ou seja, resíduos 24- 34 (L1), 50- 56 (L2) e 89- 97 (L3) no domínio variável de cadeia leve e 31-35 (H1), 50-65 (H2) e 95-102 (H3) no domínio variável de cadeia pesada; Kabat *et al*, *Sequences of Proteins of Immunological Interest,* 5ª Ed. *National Institutes of Health*, Bethesda, MD 1991) e/ou os resíduos de uma "alça hipervariável" (ou seja, os resíduos 26-32 (L1), 50-52 (L2) e 91-96 (L3) no domínio variável de cadeia leve e 26-32 (H1), 53-55 (H2) e 96-101 (H3) no domínio variável de cadeia pesada; Chothia e Lesk, *J. Mol. Biol.* 196: 901-917 (1987)). Em alguns casos, uma região de determinação de complementaridade pode incluir aminoácidos a região CDR definida de acordo com Kabat e um alça hipervariável. Por exemplo, o CDRH1 da cadeia pesada do anticorpo 4D5 inclui aminoácidos de 26 a 35. A seqüência consenso para

CDRL1 (de acordo com a definição de Kabat) no anticorpo 4D5 é R-A-S-Q-D-V-N-T-A-V-A (SEQ ID No: 29). A seqüência consenso para CDRL2 (de acordo com a definição de Kabat) no anticorpo 4D5 é S-A-S-S-L-Y-S (SEQ ID No: 30).

"Região estrutural" (no presente "FR") são resíduos do domínio variável que não são resíduos do CDR. Cada domínio variável geralmente tem quatro FRs identificados como FR1, FR2, FR3 e FR4. Se os CDRs são definidos de acordo com Kabat, os resíduos da cadeia leve de FR são posicionados a cerca dos resíduos 1-23 (LCFR1), 35-49 (LCFR2), 57-88 (LCFR3) e 98-107 (LCFR4) e os resíduos da cadeia pesada de FR são posicionados a cerca dos resíduos 1-30 (HCFR1), 36-49 (HCFR2), 66-94 (HCFR3) e 103-113 (HCFR4). Em alguns casos, quando os CDRs compreendem aminoácidos tanto dos CDRs como definido por Kabat quanto da alça hipervariável, os resíduos FR podem ser ajustados em conformidade. Por exemplo, quando CDRH1 inclui os aminoácidos H26-H35, os resíduos da cadeia pesada FR1 estão nas posições 1-25 e os resíduos FR2 nas posições 36-49.

Tal como utilizado no presente, "conjunto de códons" refere-se a um conjunto de diferentes seqüências de três nucleotídeos utilizados para codificar o variante de aminoácidos pretendido. Um conjunto de oligonucleotídeos pode ser sintetizado, por exemplo, por síntese em fase sólida, incluindo seqüências que representam todas as combinações possíveis de tríades de nucleotídeos fornecidos pelo conjunto de códons que irá codificar o grupo de aminoácidos desejado. Uma forma padrão de designação de códon é a do código EJB, que é conhecida na arte e descrita no presente. Um conjunto códons é normalmente representado por 3 letras maiúsculas em itálico, por exemplo, *NNK*, *NNS*, *XYZ*, *DVK* e similares. Síntese dos oligonucleotídeos com a "degenerescência" de nucleotídeos selecionados em determinadas posições é bem conhecida no estado da técnica, por exemplo, a abordagem TRIM (Knappek *et al.*; *J. Mol. Biol.* (1999), 296:57-86); Garrard &

Henner , *Gene* (1993), 128:103). Tais conjuntos de oligonucleotídeos com determinados conjuntos de códons podem ser sintetizados usando sintetizadores de ácidos nucléicos comerciais (disponível por, por exemplo, *Applied Biosystems*, Foster City, Califórnia), ou podem ser obtidos comercialmente (por exemplo, pela *Life Technologies*, Rockville, MD). Por isso, um conjunto de oligonucleotídeos sintetizados tendo um conjunto de códons específico irá incluir normalmente uma variedade de oligonucleotídeos com seqüências diferentes, as diferenças estabelecidas pelo conjunto de códon dentro da seqüência global. Oligonucleotídeos, tal como utilizado na presente invenção, têm seqüências que permitem a hibridização de um molde de um ácido nucléico do domínio variável e também pode, mas não necessariamente, incluir locais úteis para o uso de enzimas de restrição, por exemplo, para fins de clonagem.

O termo "conjunto de códons restrito", e variações deste, como utilizados no presente referem-se a um conjunto de códons que codifica um numero muito mais limitado de aminoácidos do que conjuntos de códons normalmente utilizados nos métodos de produção de diversidade de seqüências conhecidos na arte. Em um aspecto da invenção, os conjuntos de códons restritos utilizados para codificar a diversidade de seqüência de 2 a 10, de 2 a 8, de 2 a 6, de 2 a 4 ou apenas 2 aminoácidos. Em alguns exemplos de realização, um conjunto de códons restrito utilizados para diversificação da seqüência codifica 2, mas pelo menos 10 ou menos, 8 ou menos, 6 ou menos, 4 ou menos aminoácidos. Em um exemplo típico, um conjunto tetranomial de códons é utilizado. Exemplos incluem conjuntos de tetranomiais de códons incluem *RMC*, *RMG*, *RRC*, *RSA*, *MKC*, *YMT*, *RST*, *KMT*, *SRC*, *MRT* e *WMT*, tal como são conhecidos no estado da técnica. Em outro exemplo característico, são utilizados conjuntos de códons binomiais. Exemplos de conjuntos de códons binomiais incluem *TMT*, *KAT*, *YAC*, *WAC*, *TWC*, *TYT*, *YTC*, *WTC*, *KTT*,

YCT, *MCG*, *SCG*, *MGC*, *SGT*, *TAB*, *GKT* e *GYT*. A determinação dos códons restritos adequados, bem como a identificação específica dos aminoácidos codificados por um códon restrito específico, é bem conhecida e evidente para um especialista no assunto. As determinações dos conjuntos de aminoácidos adequados a serem utilizados para a diversificação de uma seqüência CDR pode ser empírica e/ou guiada por critérios conhecidos no estado da técnica (por exemplo, a inclusão de uma combinação de tipos de aminoácidos hidrofóbicos e hidrofílicos, etc).

Um fragmento "Fv" é um fragmento de anticorpo que contém um sítio de reconhecimento e de ligação de antígenos completo. Esta região consiste de um dímero de domínio variável de cadeia pesada e um de cadeia leve em associação firme que pode ser covalente na natureza, por exemplo, no scFv. É nesta configuração que as três CDR de cada domínio variável interagem para definir um sítio de ligação de antígenos sobre a superfície do dímero V_H-V_L. Coletivamente, as seis regiões hipervariáveis conferem especificidade de ligação de antígenos ao anticorpo. Entretanto, mesmo um domínio variável isolado (ou a metade de um Fv que compreende apenas três regiões hipervariáveis específicas para um antígeno) possui a capacidade de reconhecer e unir o antígeno, embora em afinidade mais baixa que o sítio de ligação completo.

O fragmento de "Fab" contém o domínio constante e variável da cadeia leve e o primeiro domínio constante (CH1) da cadeia pesada. Os fragmentos de anticorpos $F(ab')_2$ constam de pares de fragmentos de Fab' que são geralmente ligados por ligação covalente próximos a sua região carbóxi-terminal pelas cisteínas da região de articulação entre eles. Outros acoplamentos químicos de fragmentos dos anticorpos também são conhecidos no estado da técnica.

Fragmentos dos anticorpos "Fv de fita simples" ou "scFv"

compreendem os domínios V_H e V_L do anticorpo, no qual esses domínios estão presentes em uma única cadeia de polipeptídeo. Geralmente, o polipeptídeo Fv compreende adicionalmente um ligante de polipeptídeo entre os domínios V_H e V_L que permite que o scFv forme a estrutura desejada para a ligação aos antígenos. Para uma revisão de scFv, vide, Plückthun em *The Pharmacology of Monoclonal Antibodies*, vol. 113, Rosenburg e Moore Eds., Springer-Verlag, Nova Iorque, págs. 269-315 (1994).

O termo "diacorpos" designa pequenos fragmentos de anticorpos com dois sítios de ligação de antígenos, que compreendem um domínio pesado variável (V_H) conectado a um domínio leve variável (V_L) na mesma cadeia de polipeptídeos (V_H e V_L). Utilizando um ligante que é curto demais para permitir o pareamento entre os dois domínios sobre a mesma cadeia, os domínios são forçados a se parear com os domínios complementares de outra cadeia e criar dois sítios de ligação de antígenos. Os diacorpos são descritos mais completamente, por exemplo, na EP 404.097, WO 1993/11161 e em Hollinger *et al*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90: 6444-6448 (1993).

A expressão "anticorpos lineares" refere-se aos anticorpos descritos em Zapata *et al.*, *Protein Eng.*, 8(10):1057-1062 (1995). Resumidamente, esses anticorpos incluem um par de segmentos Fv tandem (V_H-C_H1-V_H-C_H1), que, juntamente com os polipeptídeos da cadeia leve complementar, forma um par de regiões de ligação ao antígeno. Anticorpos lineares podem ser mono ou biespecíficos.

A expressão "anticorpo monoclonal", da forma utilizada no presente, refere-se a um anticorpo obtido a partir de uma população de anticorpos substancialmente homogêneos, ou seja, os anticorpos individuais que compreendem a população são idênticos, exceto por possíveis mutações de ocorrência natural que podem estar presentes em quantidades menores. Os anticorpos monoclonais são altamente específicos, sendo dirigidos contra um

único sítio antigênico. Além disso, ao contrário das preparações dos anticorpos policlonais que incluem diferentes anticorpos dirigidos a diferentes determinantes (epítopos), cada anticorpo monoclonal é dirigido a um único determinante sobre o antígeno. O adjetivo "monoclonal" indica o caráter do anticorpo como sendo obtido a partir de uma população de anticorpos substancialmente homogênea e não deve ser considerado como exigindo a produção do anticorpo por meio de qualquer método específico. Os anticorpos monoclonais a serem utilizados de acordo com a presente invenção podem ser preparados, por exemplo, por meio do método de hibridoma descrito em primeiro lugar por Kohler *et al, Nature*, 256: 495 (1975), ou podem ser fabricados por meio de métodos de DNA recombinante (vide, por exemplo, a Patente US 4.816.567). Os "anticorpos monoclonais" podem também ser isolados a partir de bibliotecas de anticorpos de fagos, utilizando as técnicas descritas, por exemplo, em Clackson *et al, Nature*, 352: 624-628 (1991) e Marks *et al, J. Mol. Biol.*, 222: 581-597 (1991).

Os anticorpos monoclonais do presente incluem especificamente anticorpos "quiméricos" (imunoglobulinas), em que uma parte da cadeia leve e/ou pesada é idêntica ou homóloga as seqüências correspondentes em anticorpos derivados de uma espécie específica ou pertencentes a uma classe ou subclasse específica de anticorpos, enquanto o restante da(s) cadeia(s) é idêntico ou homólogo as seqüências correspondentes em anticorpos derivados de outras espécies ou pertencentes à outra classe ou subclasse de anticorpos, bem como fragmentos desses anticorpos, desde que exibam a atividade biológica desejada (Patente US 4.816.567; e Morrison *et al, Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 81: 6851-6855 (1984)).

As formas "humanizadas" dos anticorpos não humanos (por exemplo, murinos) são anticorpos quiméricos que contêm uma seqüência mínima derivada de imunoglobulina não humana. Na maior parte, os anticorpos

humanizados são imunoglobulinas humanas (anticorpo receptor), nas quais os resíduos de uma região hipervariável do paciente são substituídos por resíduos da região hipervariável de uma espécie não humana (anticorpo doador) tal como camundongo, rato, coelho ou primata não humano que possui a especificidade, afinidade e capacidade desejadas. Em alguns casos, os resíduos da região estrutural (*framework*) (FR) da imunoglobulina humana são substituídos por resíduos não humanos correspondentes. Além disso, os anticorpos humanizados podem compreender resíduos que não são encontrados no anticorpo receptor nem no anticorpo doador. Essas modificações são feitas para refinar ainda mais o desempenho do anticorpo. Geralmente, o anticorpo humanizado compreenderá substancialmente todos dentre pelo menos um, tipicamente dois domínios variáveis, em que todos ou substancialmente todas as alças hipervariáveis correspondem aos de uma imunoglobulina não humana e todas ou substancialmente todas as regiões FRs são as de uma seqüência de imunoglobulina humana. O anticorpo humanizado também compreenderá opcionalmente pelo menos uma parte da região constante de imunoglobulina (Fc), tipicamente a de imunoglobulina humana. Para detalhes adicionais, vide Jones *et al*, *Nature* 321: 522-525 (1986); Riechmann *et al*, *Nature* 332: 323-329 (1988); e Presta, *Curr. Op. Struct. Biol.* 2: 593-596 (1992).

"Anticorpo dependente de espécies" é aquele que tem uma forte afinidade de ligação para um antígeno de uma primeira espécie de mamífero do que para um antígeno homólogo de uma segunda espécie de mamífero. Normalmente, os anticorpos dependentes de espécies "ligam-se especificamente" a um antígeno humano (isto é, tem, por exemplo, uma afinidade de ligação (K_d) de valor não superior a 1×10^{-7} M, e não mais de 1×10^{-8} M, e por exemplo não mais de 1×10^{-9} M), mas tem uma afinidade de ligação a um antígeno homólogo de uma segunda espécie de mamíferos não

humanos que seja, pelo menos, cerca de 50 vezes, ou, pelo menos, 500 vezes, ou pelo menos 1000 vezes, mais fraca do que o sua afinidade de ligação para o antígeno humano. Os anticorpos dependentes de espécies pode ser qualquer um dentre os vários tipos de anticorpos, tal como definido anteriormente, mas preferencialmente é um anticorpo humanizado ou humano.

Tal como utilizado no presente, "anticorpo mutante" ou "anticorpo variante" refere-se a uma seqüência variante de aminoácido dos anticorpos dependentes de espécies em que um ou mais dos resíduos de aminoácido dos anticorpos dependentes de espécies foram alterados. Tais mutantes têm necessariamente menos de 100% de identidade de seqüência ou semelhança com os anticorpos dependentes de espécies. Em um exemplo de realização, o anticorpo mutante terá uma seqüência de aminoácidos que possuí pelo menos 75% de identidade de seqüência do aminoácido ou semelhança com a seqüência de aminoácidos, tanto do domínio variável de cadeia pesada quanto do domínio variável de cadeia leve dos anticorpos dependentes de espécies, por exemplo, pelo menos, 80 %, por exemplo, pelo menos, 85%, por exemplo, pelo menos, 90% e, por exemplo, pelo menos, 95%. Identidade ou semelhança com relação a essa seqüência é definida no presente como a porcentagem de resíduos de aminoácido na seqüência candidata que são idênticas (ou seja, mesmo resíduo) ou similares (ou seja, resíduos de aminoácidos provenientes do mesmo grupo com base nas propriedades comuns de cadeia lateral, vide abaixo) com os resíduos de anticorpos dependentes de espécies, após o alinhamento das seqüências e introdução de *gaps*, se necessário, para alcançar a porcentagem máxima de identidade na seqüência. Nenhum N-terminal, C-terminal, extensões internas, deleções ou inserções na seqüência do anticorpo fora do domínio variável deve ser interpretado como uma seqüência que afeta a identidade ou similaridade.

Um anticorpo "isolado" é aquele que tenha sido identificado,

separado e/ou recuperado a partir de um componente do seu ambiente natural. Os componentes contaminantes do seu ambiente natural são materiais que interfeririam com utilizações em diagnóstico ou terapêuticos para o anticorpo e podem incluir enzimas, hormônios e outros solutos proteináceos ou não proteináceos. Em realizações preferidas, o anticorpo será purificado (1) até mais de 95% em peso do anticorpo, conforme determinado por meio do método de Lowry, e, de maior preferência, mais de 99% em peso; (2) até o grau suficiente para a obtenção de pelo menos quinze resíduos de seqüência de aminoácidos interna ou N-terminal, utilizando um seqüenciador de copo de centrifugação (*spinning cup*); ou (3) até a homogeneidade, por meio de SDS-PAGE, sob condições redutoras ou não redutoras, utilizando azul de Coomassie ou, preferencialmente, coloração de prata. O anticorpo isolado inclui o anticorpo *in situ* em células recombinantes, desde que pelo menos um componente do ambiente natural do anticorpo não esteja presente. Normalmente, entretanto, o anticorpo isolado será preparado por meio de pelo menos uma etapa de purificação.

O termo "antagonista" é utilizado no sentido amplo da palavra e inclui qualquer molécula que bloqueia, iniba ou neutralize completamente ou parcialmente uma ou mais atividade biológica do antígeno alvo descrito no presente (por exemplo, DR5 e HER-2) *in vitro*, *in sito* ou *in vivo*. Exemplos de tais atividades biológicas do DR5 incluem a ligação ao Apo2L/TRAIL ao DR5, indução da apoptose, bem como as novas atividades relatadas na literatura. Exemplos de tais atividades biológicas do HER-2 incluem a ligação de ligantes, tais como, heregulinas, fosforilação de tirosina da HER-2, indução da proliferação, bem como a indução da apoptose, bem como novas atividades relatadas na literatura. Um antagonista pode ter função de forma direta ou indireta. Por exemplo, o antagonista pode ter a função de bloquear parcial ou totalmente, inibir ou neutralizar uma ou mais atividades biológicas de um

ligante de uma molécula alvo, de maneira *in vitro*, *in situ*, ou *in vivo*, como resultado da sua ligação direta à molécula alvo. O antagonista pode também ter função indireta para bloquear parcial ou totalmente, inibir ou neutralizar uma ou mais atividades biológicas da molécula alvo, *in vitro*, *in situ*, ou *in vivo*, como um resultado de, por exemplo, bloquear ou inibir outra molécula efetora. A molécula antagonista pode incluir uma atividade antagonista "dupla" no qual a molécula é capaz de bloquear parcial ou totalmente, inibindo ou neutralizando uma atividade biológica da molécula alvo.

O termo "agonista" é utilizado no sentido amplo da palavra e inclui qualquer molécula que melhore, estimule ou ative completamente ou parcialmente uma ou mais atividade biológica do antígeno alvo descrito no presente (por exemplo, DR5 e HER-2) *in vitro*, *in sito* ou *in vivo*. Exemplos de tais atividades biológicas do DR5 incluem a ligação ao Apo2L e apoptose, bem como as novas atividades relatadas na literatura. Exemplos de tais atividades biológicas do HER-2 incluem a ligação de ligantes, tais como, heregulinas, fosforilação de tirosina do receptor induzindo a proliferação, a apoptose, bem como novas atividades relatadas na literatura. Um agonista pode ter função de forma direta ou indireta. Por exemplo, o agonista pode ter a função de melhorar, estimular ou ativar parcial ou totalmente uma ou mais atividades biológicas de um ligante de uma molécula alvo, de maneira *in vitro*, *in situ*, ou *in vivo*, como resultado da sua ligação direta à molécula alvo que causa a ativação do receptor ou transdução de sinal. O agonista pode também ter função indireta para melhorar, estimular ou ativar parcial ou totalmente uma ou mais atividades biológicas da molécula alvo, *in vitro*, *in situ*, ou *in vivo*, por exemplo, estimulando outra molécula efetora que culminará na ativação da molécula alvo ou transdução de sinal. Contempla-se que um agonista pode atuar como um acentuador que funciona indiretamente para melhorar ou aumentar a ativação ou atividade da molécula alvo. Por exemplo, um agonista

pode melhorar a atividade endógena do Apo-2L em um mamífero. Isto poderia ser obtido, por exemplo, pela pré-complexando DR5 ou estabilizando complexos dos ligantes respectivos do receptor DR5.

"Célula", "linhagem celular" e "cultura celular" são utilizadas de forma intercambiável e essas denominações incluem todas as progênies de uma célula ou cultura celular. Desta forma, as expressões "transformadas" e "células transformadas" (ou células transformadas) incluem a célula primária e as culturas dela derivadas sem considerar a quantidade de transferências. Também se compreende que toda a prole pode não ser precisamente idêntica no contexto do DNA, devido a mutações deliberadas ou inadvertidas. As progênies mutantes que têm a mesma função ou atividade biológica selecionada para a célula originalmente modificada estão incluídas. Quando designações diferentes são pretendidas, isto será claro a partir do contexto.

A expressão "seqüências de controle" designa seqüências de DNA necessárias para a expressão de uma seqüência de codificação operacionalmente ligada em um organismo hospedeiro específico. As seqüências de controle que são apropriadas para procariotos inclue m, por exemplo, um promotor, opcionalmente uma seqüência operadora, um sítio de ligação de ribossomos e possivelmente outras seqüências ainda pouco compreendidas. As células eucarióticas são conhecidas por utilizarem promotores, sinais de poliadenilação e acentuadores (*enhancers*).

O termo "proteína da cápside" refere-se a uma proteína, ou pelo menos uma parte da qual está presente na superfície da partícula do vírus. A partir de uma perspectiva funcional, uma proteína da cápside é qualquer proteína, que está associada com uma partícula do vírus durante o processo de montagem viral na célula hospedeira, e continua associado com o vírus montado até que ele infecte outra célula hospedeira. A proteína da cápside pode ser a proteína principal da cápside (*major*) ou pode ser a proteína

secundária da cápside (*minor*). A proteína principal "*major*" é geralmente uma proteína da cápside que está presente na cápside viral em pelo menos cerca de 5, a pelo menos 7, ou no mínimo 10 cópias das proteínas ou mais. A proteína principal da cápside viral pode estar presente em dezenas, centenas ou mesmo milhares de cópias por virião. Um exemplo de uma proteína principal da cápside é a proteína do fago filamentoso P8.

O "limite de detecção" de uma entidade química, em um determinado ensaio é a concentração mínima da entidade que pode ser detectada acima do nível de fundo para essa análise. Por exemplo, no ELISA com fago o "limite de detecção" para uma determinada exibição de um fragmento ligante de antígeno específico por fago é a concentração do fago no qual o fago específico produz um sinal no ELISA abaixo do produzido por um fago controle que não exiba o fragmento de ligação ao antígeno.

"Receptor DR5" ou "DR5" quando utilizado no presente engloba seqüências nativas do receptor e seqüências variantes do receptor. Estes termos abrangem receptores DR5 expressos em uma variedade de mamíferos, incluindo seres humanos. O receptor DR5 pode ser expresso endogenamente como ocorre naturalmente em uma variedade linhagens de tecidos humanos, ou podem ser expressos por métodos sintéticos ou recombinantes. Uma "seqüência nativa do receptor DR5" compreende um polipeptídeo com a mesma seqüência de aminoácidos de um receptor DR5 derivado da natureza. Assim, uma seqüência nativa do receptor DR5 pode ter a seqüência de aminoácidos que ocorrem naturalmente no receptor DR5 de qualquer mamífero. Tais seqüências de receptor DR5 nativas podem ser isoladas da natureza ou podem ser produzidas por meios sintéticos ou recombinantes. O termo "seqüência nativa do receptor DR5" engloba especificamente formas que ocorrem naturalmente secretadas ou eliminadas (por exemplo, uma forma solúvel, contendo, por exemplo, uma seqüência do domínio extracelular),

formas variantes que ocorrem naturalmente (por exemplo, formas co *splicing* alternativos) e variantes alélicos naturais. Variantes do receptor podem incluir fragmentos ou mutantes por deleção das seqüências nativas do receptor DR5. A seqüência de 411 aminoácidos do DR5 humano é demonstrada na Tabela 1 e é a seqüência da Figura 3A, assim como publicado no documento WO 98/51793 em 19 de novembro de 1998. Um *splicing* transcricional do DR5 variante humano é conhecido no estado da técnica. Este *splice* variante de DR5 codifica a seqüência de 440 aminoácidos do DR5 humano demonstrado nas figuras 3B e 3C conforme publicado no documento WO 98/35986 em 20 de agosto de 1998. As seqüências de polipeptídeo do DR5 murino e um domínio extracelular do DR5 também são apresentados na Tabela 1 abaixo.

Atividades biológicas do DR5 incluem (a) capacidade de induzir ou estimular ou sinalizar a apoptose em, pelo menos, um tipo de células de câncer de mamíferos ou células infectadas por vírus *in vivo* ou *ex vivo*, (b) capacidade de se ligar ao polipeptídeo Apo2L/TRAIL de ocorrência natural. Ensaios para determinar a atividade biológica, como a apoptose pode ser realizado por meio de métodos conhecidos na arte, como a fragmentação do DNA (vide, por exemplo, Marsters *et al.*, *Curr. Biology*, 6: 1669 (1996)), inativação da caspase, ligação ao DR5 (vide., por exemplo, o documento WO 98/51793, publicado em 19 de Novembro, 1998. Os termos "apoptose" e "atividade apoptótica" é utilizada no sentido amplo, e referem-se à morte celular de forma ordenada ou controlada em mamíferos que, geralmente, é acompanhada por um ou mais eventos celulares característicos, incluindo a condensação do citoplasma, perda das microvilosidades da membrana plasmática, segmentação do núcleo, degradação do DNA cromossômico ou perda da função mitocondrial. Esta atividade pode ser determinada e mensurada, por exemplo, por ensaios de viabilidade celular (tal como coloração por *Alamar blue* ou ensaios MTT), análise por FACS, ativação da caspase,

fragmentação do DNA (vide, por exemplo, Nicoletti *et al.*, *J. Immunol. Methods*, 139:271-279 (1991), e polimerase poli-ADP ribose, "PARP", ensaio de clivagem conhecidos no estado da técnica.

"Anticorpo para receptor de DR5", "anticorpos DR5", ou "anticorpos anti-DR5" são utilizados em um sentido amplo, para se referir a anticorpos que se ligam a pelo menos uma forma de um receptor DR5. Opcionalmente o anticorpo DR5 é fundido ou ligado a uma seqüência ou molécula heteróloga. De preferência a seqüência heteróloga permite ou ajuda o anticorpo formar complexos oligoméricos ou de ordem superior. Opcionalmente, o anticorpo DR5 se liga a receptores DR5 mas não se liga ou reage cruzadamente com qualquer receptor Apo-2L adicional (por exemplo, RP4, DcRI, ou DcR2). Opcionalmente, o anticorpo é um agonista da sinalização da atividade de DR5. Opcionalmente, o anticorpo DR5 da invenção liga-se a um receptor DR5 em uma concentração entre 0,1 nM a 20 mM, como mensurado em um ensaio de ligação BIAcore (tal como descrito no presente) Opcionalmente, alguns exemplos de realização, os anticorpos da invenção exibem um valor de IC_{50} de cerca de 1 nM a cerca de 20 nM como mensurado em um teste de ligação (como, por exemplo, ELISA com fagos, como descrito nos exemplos abaixo).

Os termos "Apo2L/TRAIL", "Apo-2L", e "TRAIL" são utilizados no presente para se referir a uma seqüência de polipeptídeos no qual inclui os resíduos de aminoácidos 114-281, inclusive os resíduos, 95-281, inclusive os resíduos, 92-281, inclusive os resíduos, 91-281, inclusive os resíduos, 41-281, inclusive os resíduos, 15-281, inclusive os resíduos, 1-281, da seqüência de aminoácidos exibida na Tabela 1, bem como os fragmentos biologicamente ativos, variantes com deleções, inserções ou substituições das seqüências referidas acima. Os polipeptídeos da Apo-2L podem ser codificados pelas seqüências nucleotídicas nativas como descrito e apresentado na Figura 1 do

documento WO2005100399.

Uma "proteína de fusão" e "polipeptídeo de fusão" referem-se a um polipeptídeo que possuí duas porções ligadas covalentemente entre si, onde cada uma das porções é um polipeptídeo que possui uma propriedade diferente. A propriedade pode ser uma propriedade biológica, como a atividade *in vitro* ou *in vivo*. A propriedade também pode ser uma simples propriedade física ou química, tal como ligação a um antígeno alvo, uma reação de catálise e etc. As duas porções podem ser diretamente ligadas por uma única ligação peptídica ou através de um peptídeo ligante contendo um ou mais resíduos de aminoácidos. Geralmente, as duas porções e o ligante estarão no quadro de leitura juntos. Em certos exemplos de realização, as duas porções do polipeptídeo ou são obtidos de polipeptídeos diferentes ou heterólogos.

"DNA heterólogo" é qualquer DNA que é introduzida em uma célula hospedeira. O DNA pode ser derivado de diversas fontes, incluindo DNA genômico, cDNA, DNA sintético e fusões ou combinações destes. O DNA pode incluir DNA de uma mesma célula ou tipo celular como células hospedeiras ou receptoras ou DNA de tipos de células diferentes, por exemplo, de um mamífero ou vegetal. O DNA pode, opcionalmente, incluir um gene marcador ou de seleção, por exemplo, genes que conferem resistência aos antibióticos, genes que conferem resistência à temperatura e etc.

Tal como utilizado no presente, "posição altamente diversificada" refere-se a posição de um aminoácido localizado nas regiões variáveis de cadeias leves e pesadas que possui um número de aminoácidos diferentes na posição quando comparados com seqüências de aminoácidos ou fragmentos ligantes ao antígeno conhecidos e/ou de ocorrência natural. As posições altamente diversificadas estão geralmente nas regiões CDR. Em um aspecto, a capacidade de determinar posições altamente diversificadas em anticorpos conhecidos e/ou de ocorrência natural é facilitada pelos dados fornecidos por

Kabat, *Sequences of Proteins of Immunological Interest* (*National Institutes of Health*, Bethesda, Md, 1987 e 1991). Um banco de dados baseado na Internet localizado no endereço http//:www.bioinf.org.uk.abs.structures.html oferece uma extensa coleção e alinhamentos das seqüências de cadeia leve (http//:www.biomf.org.uk.abs.lc.align) e cadeia pesada (http//:www.bioinf.org.uk.abs.hc.align) e facilita a determinação das posições altamente diversificadas, nestas seqüências. De acordo com a invenção, uma posição de aminoácido é altamente diversificada, se possuir cerca de 2 a 11, a partir de 4 a 9, e/ou cerca de 5 a 7 possíveis variações diferentes nas posições dos resíduos de aminoácidos. Em alguns exemplos de realização, uma posição de aminoácido é altamente diversificada, se tiver, pelo menos, cerca de 2, pelo menos cerca de 4, pelo menos cerca de 6, e/ou, pelo menos cerca de 8 possíveis variações diferentes nas posições dos resíduos de aminoácidos.

Tal como utilizado no presente, "biblioteca" refere-se a uma variedade de seqüências de anticorpos ou fragmentos de anticorpos (por exemplo, os polipeptídeos da invenção), ou os ácidos nucléicos que codificam essas seqüências, sendo estas seqüências diferentes na combinação de variantes de aminoácidos que são introduzidas nessas seqüências de acordo com os métodos da invenção.

"Ligação" é o processo de formação ligações de fosfodiésteres entre os dois fragmentos de ácidos nucléicos. Para a ligação dos dois fragmentos, as extremidades dos fragmentos devem ser compatíveis entre si. Em alguns casos, as extremidades serão diretamente compatíveis após a digestão com endonucleases. No entanto, pode ser necessário primeiro converter a extremidade escalonada comumente produzida após a digestão com endonucleases para uma extremidade cega e torná-la compatível para a ligação. Para produzir uma extremidade cega, o DNA é tratado em um tampão adequado por, pelo menos, 15 minutos a 15 °C, com cerca de 10 unidades do

fragmento Klenow da DNA polimerase I ou DNA polimerase T4, na presença dos quatro desoxirribonucleotídeos trifosfatos. O DNA é então purificado por extração em fenol-clorofórmio e precipitação em etanol ou purificação por sílica. Os fragmentos de DNA que serão ligados são colocados em uma solução com quantidades equimolares. A solução também irá conter ATP, tampão para ligase e uma ligase como, por exemplo, T4 DNA ligase, cerca de 10 unidades por 0,5/µg de DNA. Se o DNA é ou está ligado em um vetor, o vetor é primeiro linearizado pela digestão com endonuclease(s) de restrição adequada(s). O fragmento linear é então tratado com fosfatase alcalina bacteriana ou fosfatase alcalina do intestino bovino para evitar auto ligação durante a etapa de ligação. Outros métodos são bem conhecidos no estado da técnica.

A "mutação" é uma deleção, inserção, ou substituição de um(alguns) nucleotídeo(s) em relação a uma seqüência nucleotídica de referência como, por exemplo, uma seqüência do tipo selvagem.

A expressão anticorpo "natural" ou "naturalmente" da forma como é utilizada no presente, refere-se aos anticorpos identificados a partir de uma fonte não sintética, por exemplo, a partir de um antígeno diferenciado específico de células B obtido *ex vivo*, ou sua linhagem de hibridoma celular correspondente, ou a partir de anticorpos obtidos do soro de um animal. Estes anticorpos podem incluir anticorpos produzidos em qualquer tipo de resposta imune, quer seja natural ou induzida de outra forma. Anticorpos naturais incluem as seqüências de aminoácidos, e seqüências de nucleotídeos que constituem ou codificam esses anticorpos, por exemplo, como identificado no banco de dados de Kabat. Da forma como é aqui utilizado, anticorpos naturais são diferentes de "anticorpos sintéticos", anticorpos sintéticos referem-se a seqüência de anticorpo que foram alteradas a partir de uma seqüência fonte ou modelo, por exemplo, através da substituição, deleção ou adição de um aminoácido, ou mais de um aminoácido, em uma determinada posição com um

aminoácido diferente, os aminoácidos diferentes fornecem uma seqüência de anticorpo diferente a partir da seqüência de anticorpo fonte.

"Operacionalmente ligado" refere-se a um ácido nucléico significa que o ácido nucléico é colocado em relação funcional com outra seqüência de ácido nucléico. O DNA para uma seqüência prévia ou líder de secreção, por exemplo, é operacionalmente ligado ao DNA que codifica um polipeptídeo caso este seja expresso na forma de pré proteína que participa da secreção do polipeptídeo; um promotor ou acentuador (*enhancer*) é operacionalmente ligado a uma seqüência de codificação caso afete a transcrição da seqüência; ou um sítio de ligação de ribossomos é operacionalmente ligado a uma seqüência de codificação caso seja posicionado de forma a possibilitar a tradução. Geralmente, "operacionalmente ligado" indica que as seqüências de DNA ligadas são contíguas e, no caso do líder de secreção, contíguas e estão no quadro de leitura. Os acentuadores, entretanto, não necessitam ser contíguos. A ligação é realizada por meio de ligação em sítios de restrição convenientes. Caso estes sítios não existam, adaptadores de oligonucleotídeos sintéticos ou ligantes são utilizados de acordo com a prática convencional.

"Exibição por fagos" é uma técnica na qual polipeptídeos variantes são exibidos como proteínas de fusão a pelo menos uma porção da proteína da cápside na superfície do fago, por exemplo, fago filamentoso, partículas. A utilidade da exibição por fagos reside no fato de que grandes bibliotecas de proteínas variantes aleatorizadas podem ser rapidamente e eficazmente classificadas para aquelas seqüências que se ligam a um antígeno alvo com alta afinidade. A exposição do peptídeo e da biblioteca de proteína por fago tem sido utilizada para a triagem de milhões de polipeptídeos pra selecionar aqueles com propriedades de ligação específicas. Métodos de exibição por fago polivalente foram utilizados para exibir pequenos peptídeos aleatorizados e pequenas proteínas através de fusões tanto com gene III

quanto com o gene VIII do fago filamentoso. Wells e Lowman, *Curr. Opin. Struct. Biol*, 3:355-362 (1992), e as referências nele citada. Em uma exibição por fago monovalente, uma biblioteca de proteína ou peptídeo é fundida com um gene III ou parte deste, e expresso em níveis baixos na presença do gene da proteína III do tipo selvagem de modo que as partículas do fago exibem uma cópia ou nenhuma das proteínas de fusão. Os efeitos da avidade são relativamente reduzidos no fago polivalente de modo que a classificação é com base na afinidade intrínseca do ligante, e vetores de fagomídeos é utilizado, o que simplificará as manipulações do DNA. Lowman e Wells, *Methods: A companion to Methods in Enzymology*, 3:205-0216 (1991).

Um "fagomídeo" é um plasmídeo vetor tendo uma replicação de origem bacteriana, por exemplo, ColE1, e uma cópia de uma região intergênica de um bacteriófago. O fagomídeo pode ser utilizado em qualquer bacteriófago conhecido, incluindo bacteriófago filamentoso e bacteriófago lambdóide. O plasmídeo geralmente também irá conter um marcador selecionável para a resistência aos antibióticos. Segmentos de DNA clonados nestes vetores podem ser propagados como plasmídeos. Quando células contendo os vetores são fornecidas com todos os genes necessários para a produção de partículas de fago, o modo de replicação do plasmídeo altera o rolamento círculo replicação para gerar cópias de uma cepa do DNA plasmidial e partículas do envelope do fago. O fagomídeo pode formar partículas de fago infecciosas e mão infecciosas. Este termo inclui fagomídeos que contêm um gene da proteína da cápside do fago ou um fragmento desse ligado a um polipeptídeo heterólogo como um gene de fusão de tal forma que o polipeptídeo heterólogo é exibido na partícula da superfície do fago.

O termo "vetor de fago" significa uma forma replicativa de dupla fita de um bacteriófago contendo um gene heterólogo e capaz de replicação. O vetor de fago tem a origem de replicação do fago permitindo a replicação e a

formação da partícula de fago. Em certos exemplos de realização, o fago é um bacteriófago filamentoso, tal como, fago M13, fl, fd, Pf3 ou um derivado destes, ou um fago lambdóide, tais como lambda, 21, phi80, phi81, 82, 424, 434 e etc, ou um derivado destes.

"Oligonucleotídeos" são polidesoxinucleotídeos de comprimento curto, fita única ou dupla que são quimicamente sintetizados por métodos conhecidos (como, por exemplo, químicos fosfotriéster, fosfito ou fosforamidita, utilizando técnicas de fase sólida como descrito no documento EP 266032 publicado em 4 de Maio de 1988, ou através de deoxinucleosídeo H-fosfonato, como descrito por Froeshler *et al.*, *Nucl. Acids. Res.*, 14:5399-5407 (1986)). Métodos adicionais incluem reação em cadeia da polimerase definido abaixo e outros métodos com auto *primer* e sínteses de oligonucleotídeos em suportes sólidos. Todos esses métodos estão descritos em Engels *et al.*, *Agnew. Chem. Int. Ed. Engl*, 28:716-734 (1989). Estes métodos são utilizados se a seqüência completa de ácido nucléico dos genes é conhecida, ou se seqüência dos ácidos nucléicos complementares a fita de codificação está disponível. Alternativamente, se a seqüência de aminoácido alvo é conhecida, pode se inferir as seqüências potenciais de ácidos nucléicos utilizando resíduos de codificação conhecidos e preferidos para cada resíduo de aminoácido. Os oligonucleotídeos podem ser purificados em gel de poliacrilamida ou colunas de dimensões moleculares ou por precipitação.

O DNA é "purificado" quando o DNA está separado de impurezas que não são ácidos nucléicos. As impurezas podem ser polares, não-polares, iônicas e etc.

Um "anticorpo fonte", da formo como é utilizado no presente, refere-se a um anticorpo ou fragmento que se liga a um antígeno cuja seqüência serve como uma seqüência modelo sobre a qual a diversificação de acordo com os critérios descritos no presente é realizada. Em certos exemplos

de realização, uma seqüência ligante ao antígeno geralmente inclui uma região variável de anticorpo, e, pelo menos, um CDR incluindo a região estrutural.

A expressão "posição acessível ao solvente" da forma como utilizada no presente, refere-se a uma posição de um resíduo de aminoácido nas regiões variáveis da cadeia leve e pesada de um anticorpo fonte ou fragmento ligante ao antígeno que é determinado, baseado na estrutura, agrupado na estrutura e/ou modelado na estrutura do anticorpo ou fragmento ligante ao antígeno, como potencialmente disponível para acesso ao solvente e/ou entrando em contato com uma molécula, tal como, um antígeno específico para o anticorpo. Estas posições são normalmente encontradas nos CDRs e no exterior da proteína. As posições acessíveis ao solvente de um anticorpo ou fragmento ligante ao antígeno, tal como definido no presente, pode ser determinada utilizando um número de algoritmos conhecidos no estado da técnica. Em certos exemplos de realização, a posição acessível ao solvente são determinadas usando coordenadas de modelos tri-dimensionais de um anticorpo (ou parte dele, por exemplo, um domínio variável de anticorpo, ou segmento(s) CDR), utilizando um programa de computador, como o programa Insight II (*Accelrys*, San Diego, Califórnia). Posições acessíveis ao solvente também pode ser determinadas utilizando algoritmos conhecidos no estado da técnica (por exemplo, Lee e Richards, *J. Mol. Biol.* 55, 379 (1971) e Connolly, *J. Appl. Cryst.* 16, 548 (1983)). A determinação das posições acessíveis ao solvente podem ser realizadas utilizando um *software* adequado para modelagem e obtenção da informação estrutural tri-dimensional da proteína a partir de um anticorpo (ou porção deste). O *software* que pode ser utilizado para esses fins é o SYBYL *Biopolymer Module software* (*Tripos Associates*). Geralmente, em certos exemplos de realização, onde um algoritmo (programa), exija o uso de entrada do parâmetro tamanho, o "tamanho" de uma sonda que é utilizada no cálculo é fixada em cerca de 1,4 Angstrom ou menor. Além disso,

a determinação de regiões acessíveis ao solvente utilizando e métodos da área utilizando um *software* para computadores pessoais foram descritos por Pacios ((1994) "*ARVOMOL/CONTOUR: molecular surface areas and volumes on Personal Computers.*" *Comput. Chem.* 18(4):377-386; e (1995). "*Variations of Surface Areas and Volumes in Distinct Molecular Surfaces of Biomolecules.*" *J. Mol. Model.* 1:46-53.)

Um "elemento regulador de transcrição" irá conter um ou mais dos seguintes elementos: um elemento potenciador (*enhancer*), um promotor, uma seqüência operadora, um gene repressor e uma seqüência de parada de transcrição. Estes componentes são bem conhecidos no estado da técnica. Patente US 5.667.780.

Uma célula " transformada" é uma célula que recebe e mantém o DNA como evidenciado pela expressão de um fenótipo associado com o DNA (por exemplo, a resistência aos antibióticos conferida por uma proteína codificada pelo DNA).

"Modificação" refere-se a um processo pelo qual uma célula recebe o DNA torna-se uma célula "transformada". A captação do DNA pode ser permanente ou transitória.

Um "anticorpo humano" é aquele que possuí uma seqüência de aminoácidos que corresponde ao de um anticorpo produzido por um humano e/ou tenha sido feito usando qualquer uma das técnicas de produção de anticorpos humanos como divulgado no presente. Esta definição de anticorpo humano exclui especificamente um anticorpo humanizado conta de resíduos de ligação ao antígeno não-humano.

Anticorpo "maturado por afinidade" é aquele com uma ou mais alterações em uma ou mais de suas CDRs, o que resulta em aumento da afinidade do anticorpo para o antígeno, em comparação com anticorpo parental que não possui essa(s) alteração(ões). Em exemplos de realização preferidos,

os anticorpos maturados por afinidade possuirão afinidades nanomolares ou até picomolares para o antígeno alvo. Os anticorpos maturados por afinidade são produzidos através de procedimentos conhecidos na técnica. Marks et al., *Bio/Technology*, 10: 779-783 (1992) descreve a maturação por afinidade através de troca de domínios VH e VL. A mutagênese aleatória de resíduos de estrutura e/ou CDR é descrita por: Barbas et al., *Proc. Natl. Acad. Sci., U. S. A.* 91: 3809-3813 (1994); Schier et al., *Gene*, 169: 147-155 (1995); Yelton et al., *J. Immunol.,* 155: 1994-2004 (1995); Jackson et al., *J. Immunol.*, 154 (7): 3310-9 (1995); e Hawkins et al., *J. Mol. Biol.,* 226: 889-896 (1992).

O "Kd" ou " valor de Kd " é a constante de dissociação para a interação de uma molécula com outra. Em um exemplo de realização, o valor de Kd é medida por um teste de ligação a uma proteína radiomarcada (RAI) . Em um exemplo de realização, um ensaio de RIA para DR5 ou HER-2 pode ser realizado com a versão Fab de um anticorpo anti-DR5 ou anti-HER-2 e uma molécula DR5 e HER-2, respectivamente, como descrito pelo seguinte ensaio mensura a afinidade de ligação em uma solução de Fabs para DR5 ou HER-2 equilibrando um Fab com uma concentração mínima de DR5 ou HER-2 marcados (I^{125}), na presença de uma titulação seriada de DR5 ou HER-2 não marcada, respectivamente, ou então capturando moléculas ligadas a DR5 ou HER-2 respectivamente com uma placa revestida com anticorpos anti-Fab (Chen, *et al.*, (1999) *J. Mol Biol* 293:865-881). Para estabelecer as condições para que o ensaio, placas de microtitulação (Dynex) são revestidas durante a noite com 5 µg/ml de anticorpo anti-Fab (Cappel Labs), em 50 mM de carbonato de sódio (pH 9,6) e, posteriormente, bloqueado com 2% (p/v) de albumina bovina em PBS por duas a cinco horas em temperatura ambiente (cerca de 23 °C). Em uma placa não-adsorvida (Nunc # 269620), 100 pM ou 26 pM de DR5 ou HER-2 [I^{125}] são misturadas com em diluições seriadas do Fab de interesse, por exemplo, Fab-12 (Presta *et al.*, (1997) *Cancer Res.* 57:4593-

4599). A Fab de interesse é, em seguida, incubada *overnight*, no entanto, a incubação pode continuar por 65 horas para garantir que o equilíbrio seja atingido. Em seguida, as misturas são transferidas para a placa de captura para incubação à temperatura ambiente durante uma hora. A solução é então retirada e a placa lavada oito vezes com Tween-20 a 0,1%, em PBS. Quando as placas estiverem secas, 150µL/poço de cintilante (MicroScint-20; Packard) é adicionado, e as placas são contadas em um contador *Topcount gamma* (Packard) durante dez minutos. As concentrações de cada Fab que forem igual ou menor a 20% da ligação máxima são escolhidos para serem utilizados em ensaios ligação por competição

De acordo com outro exemplo de realização o Kd ou valor de Kd pode ser mensurado pelo ensaio de ressonância plasmônica de superfície utilizando o BIAcore™-2000 ou um BIAcore™-3000 (BIAcore, Inc., Piscataway, NJ). Em um exemplo de realização, o valor de Kd da molécula de anticorpo anti-DR5 ou anti-HER-2 é determinada utilizando uma análise BIAcore™ de acordo com o seguinte protocolo. Resumidamente, chips de biosensores de destrano carboximetilados (CM5, BIAcore Inc.) são ativados com cloridrato de N-etil-N'-(3-dimetilaminopropil)-carbodiimida (EDC) e N-hidroxisucinimida (SNS) de acordo com as instruções do fornecedor. O DR5 ou HER-2 humano é diluído com 10 mM de acetato de sódio, pH 4,8, para 5 µg/ml (~ 0,2 µM) antes de injetar a uma velocidade de fluxo de 5 µl/minuto para atingir aproximadamente 10 unidades de resposta (RU) de proteína acoplada. Após a injeção do DR5 ou HER-2 humano, 1M de etanolamina é adicionada para bloquear grupos não reacionados. Para a mediação cinética, diluições seriadas em duplicatas de Fab (0,78 nM e 500 nM) são injetados em PBS com 0,05% de Tween-20 (PBST) a 25 °C em uma taxa de fluxo de cerca de 25 µl/min. A velocidade de associação (k_{on}) e a velocidade de dissociação (k_{off}) são calculadas utilizando um modelo de ligação simples um-para-um de Langmuir

(BIAcore Evaluation Software version 3.2) pela montagem simultânea de sensogramas de associação e dissociação. A constante de dissociação em equilíbrio (Kd) é calculado como a relação k_{off}/k_{on}. Vide, por exemplo, Chen, Y., et al., (1999) J. Mol Biol 293:865-881.

Um "distúrbio" é qualquer condição que poderia se beneficiar pelo tratamento com uma substância/molécula ou método da invenção. Isto inclui doenças agudas e crônicas ou doenças incluindo aquelas condições patológicas que predispõem o mamífero para o distúrbio em questão. Exemplos não limitantes de doenças a ser tratadas no presente incluem tumores malignos e benignos; malignidades linfóides e não leucêmicas; distúrbios neuronais, gliais, astrocitais, do hipotálamo e outros distúrbios glandulares, macrofágicos, epiteliais, estromais e blastocélicos; e distúrbios inflamatórios e doenças imuno-relacionadas.

Os termos "distúrbio da proliferação celular" e "desordem proliferativa" referem-se a distúrbios que estão associados com algum grau de proliferação de células anormais. Em exemplo de realização, a desordem proliferativa é o câncer.

"Tumor", como é utilizado no presente, refere-se ao crescimento e multiplicação de todas as células neoplásicas, quer sejam malignas ou benignas, e todas as células e tecidos pré-cancerosos e cancerosos. Os termos "câncer", "cancerosos", "distúrbio da proliferação celular", "desordem proliferativa" e "tumor" não são mutuamente exclusivos como referido no presente.

O termo "câncer" e "canceroso" refere-se a ou descreve a condição fisiológica em mamíferos que é tipicamente caracterizada pelo crescimento/proliferação celular não regulada. Exemplos de câncer incluem, mas sem limitar-se a, carcinoma, linfoma, blastoma, sarcoma, e leucemia. Exemplos mais particulares de ditos cânceres incluem câncer de células escamosas, câncer do pulmão de células pequenas, câncer do pulmão de

células não-pequenas, adenocarcinoma do pulmão, carcinoma escamoso do pulmão, câncer do peritônio, câncer hepatocelular, câncer gastrointestinal, câncer pancreático, glioblastoma, câncer cervical, câncer do ovário, câncer do fígado, câncer da bexiga, hepatoma, câncer de mama, câncer do cólon, câncer colorretal, carcinoma endometrial ou uterino, carcinoma de glândulas salivares, câncer dos rins, câncer do fígado, câncer de próstata, câncer vulval, câncer da tireóide, carcinoma hepático, e vários tipos câncer de câncer da cabeça e pescoço.

O termo "doença imune relacionada" designa uma doença onde um componente do sistema imunológico de um mamífero causa, medeia ou contribui de uma outra maneira para a morbidade do mamífero. Também estão inclusos doenças que estimulam ou interferem na resposta imune tendo um efeito ameliorativo na progressão da doença. Incluído com este termo estão doenças auto-imunes, doenças inflamatórias imuno-mediadas, doenças infecciosas e imunodeficiências. Exemplos de doenças relacionadas e doenças inflamatórias, algumas dos quais são imunes ou mediadas por células T, que podem ser tratadas de acordo com a invenção incluem lúpus eritematoso, artrite reumatóide, artrite crônica juvenil, espondiloartropatias, esclerose sistêmica (escleroderma), miopatia inflamatória idiopática, (dermatomiosites, polimiosites), sindrome de Sjögren, vasculite sistêmica, sarcoidose, anemia hemolítica autoimune (pancitopenia imune, hemoglobinúria paroxística noturna), trombocitopenia autoimune (trombocitopenia idiopática púrpura, trombocitopenia imuno-mediada), tireoidites (doença de Grave, tireoidite de Hashimoto, tireoidite linfocítica juvenil, tireoidite atrópica), diabetes mellitus, doença renal imuno-mediada (glomerulonefrite, nefrite tubulointersticial), doença desmielinizante do sistema nervoso central e periférico, tal como esclerose múltipla, polineuropatia desmielinizanate idiopática ou síndrome de Guillain-Barré e polineuropatia desmielinizanate inflamatória crônica, doenças hapatobiliares tais como hepatite infecciosa (hepatites A, B, C, D, E e outros

vírus não-hepatotrópicos), hepatite ativa crônica autoimune, cirrose biliar primária, hepatite granulomatosa, e colangite esclerosante, doenças fibróticas e inflamatórias do pulmão, respostas associadas à doença intestinal inflamatória (doença de Crohn, colite úlcerativa), enteropatia glúten-sensível, e doença de Whipple, doenças da pele autoimunes ou mediadas pelo sistema imunológico, incluindo doenças da pele bolhosas, eritema multiforme e dermatite de contato, psoríase; doenças alérgicas tais como asma, rinite alérgica, dermatite atópica, hipersensibilidade alimentícia e urticária; doenças imunológicas do pulmão, tais como pneumonia eosinofílica.

O termo "doença autoimune" no presente é utilizado no sentido amplo, em geral o sentido refere aos distúrbios ou condições nos mamíferos em que a destruição de tecidos saudáveis ou normais ocorre a partir da resposta imune celular ou humoral do indivíduo mamífero contra o seu próprio tecido. Os exemplos incluem, mas não se limitam a, lúpus eritematoso sistêmico, tireoidite, artrite reumatóide, psoríase, esclerose múltipla, diabetes autoimune, e doença inflamatória intestinal (IBD).

Da forma utilizada no presente, "tratamento" indica intervenção clínica em tentativa de alterar o curso natural do indivíduo ou da célula sendo tratada e pode ser realizado para profilaxia ou durante o transcurso de patologia clínica. Os efeitos desejáveis de tratamento incluem a prevenção da ocorrência ou reincidência da doença, alívio dos sintomas, redução de quaisquer conseqüências patológicas diretas ou indiretas da doença, prevenção de metástase, redução da velocidade de progresso da doença, melhoria ou redução do estado doentio e remissão, ou melhor prognóstico. Em alguns exemplos de realização, os anticorpos da invenção são usados para atrasar o desenvolvimento da doença ou distúrbio.

"Quantidade eficaz" designa quantidade eficaz, em dosagens e por períodos de tempo necessários, para atingir o resultado terapêutico ou

profilático desejado.

Uma "quantidade terapeuticamente eficaz" da substância ou molécula da invenção,agonista ou antagonista pode variar de acordo com fatores tais como o estado da doença, idade, sexo e peso do indivíduo, bem como a capacidade do anticorpo de permitir reação desejada no indivíduo. Uma quantidade terapeuticamente eficaz também é aquela em que qualquer efeito tóxico ou prejudicial do anticorpo é superado pelos efeitos terapeuticamente benéficos. "Quantidade profilaticamente eficaz" designa quantidade eficaz, em dosagens e por períodos de tempo necessários, para atingir o resultado profilático desejado. Tipicamente, como a dose profilática é utilizada em pacientes antes ou em estado inicial da doença, a quantidade profilaticamente eficaz será menor que a quantidade terapeuticamente eficaz.

"Mamífero", para fins de tratamento, indica qualquer animal classificado como mamífero, incluindo seres humanos, animais domésticos e de fazenda, animais de zoológico, esportivos ou domésticos, tais como cães, cavalos, gatos, vacas etc.

O termo "composição anti-neoplásica" refere-se a uma composição útil no tratamento do câncer incluindo pelo menos um agente terapêutico ativo, por exemplo, "agente anti-câncer." Exemplos de agentes terapêuticos (agentes anti-câncer) incluem, mas não estão limitados a, por exemplo, agentes quimioterápicos, agentes inibidores de crescimento, agentes citotóxicos, agentes utilizados na radioterapia, agentes anti-angiogênese, agentes apoptóticos, agentes anti-tubulina, e outros agentes para o tratamento do câncer, como, por exemplo, anticorpos anti-CD20, antagonista do receptor do fator de crescimento epidérmico (EGFR) (por exemplo, um inibidor da tirosina quinase), inibidores de HER1/EGFR (por exemplo, erlotinib (Tarceva™), inibidores do fator de crescimento derivado de plaquetas (por exemplo, Gleevec™ (Imatinib Mesylate)), um inibidor da COX-2 (por exemplo,

o celecoxib), interferons, antagonistas de citocinas, (por exemplo, anticorpos neutralizantes) que se ligam a uma ou mais dos seguintes alvos receptores ErbB3, ErbB4, PDGFR-beta, BlyS, APRIL, BCMA ou VEGF, TRAIL/Apo2 e outros agentes bioativos e químicos biológicos e etc. Combinações, estão igualmente incluídas na invenção.

O termo "epítopo marcado" quando utilizado no presente refere-se a um anticorpo mutante fundido a um "marcador do epítopo". O polipeptídeo do marcador do epítopo tem resíduos suficientes para fornecer um epítopo contra o qual um anticorpo contra este pode ser feito, sendo ainda curto o suficiente para que este não interfira com a atividade do anticorpo mutante. O marcador de epítopo preferencialmente também é bastante singular a fim de que o anticorpo não reaja cruzadamente contra outros epítopos. Polipeptídeo marcadores adequados têm, geralmente, pelo menos 6 resíduos de aminoácido e, geralmente, entre cerca de 8-50 resíduos de aminoácidos (em certos exemplos de realização, entre cerca de 9-30 resíduos). Os exemplos incluem, mas não estão limitados a, polipeptídeo marcador flu HA e seus anticorpos 12CA5 (Field *et al. Mol. Cell. Biol.* 8:2159-2165 (1988)); o marcador c-myc e os anticorpos contra estes 8F9, 3C7, 6E10, G4, B7 e 9E10 (Evan *et al, Mol. Cell. Biol.* 5 (12) :3610-3616 (1985)); e o marcador glicoproteína D (gD) do vírus da Herpes e seus anticorpos (Paborsky *et al., Protein Engineering* 3(6):547-553 (1990)). Em certos exemplos de realização, o marcador de epítopo é um "epítopo ligado a receptor recuperado".

A expressão "agente citotóxico", da forma utilizada no presente, indica uma substância que inibe ou evita o funcionamento das células e/ou causa destruição das células. A expressão destina-se a incluir isótopos radioativos (tais como At^{211}, I^{131}, I^{125}, Y^{90}, Re^{186}, Re^{188}, Sm^{153}, Bi^{212}, P^{32} e isótopos radioativos de Lu), agentes quimioterápicos, por exemplo, metotrexato, adriamicina, alcalóides vinca (vincristina, vinblastina, etoposida),

doxorubicina, melfalan, mitomicina C, clorambucil, daunorubicina ou outros agentes intercalantes, enzimas e fragmentos destes como, por exemplo, ezimas nucleotídeas, antibióticos e toxinas como, por exemplo, pequenas moléculas de toxina ou toxinas ezimáticamente ativas de origem bacteriana, fúngica, vegetal ou animal, incluindo fragmentos ou variantes destes, e vários agentes anti-câncer ou anti-tumor descritos abaixo. Outros agentes citotóxicos estão descritos abaixo. Um agente tumoricida causa destruição das células tumorais.

Um "agente quimioterápico" é um composto químico útil no tratamento de condições como o câncer. Exemplos de agentes quimioterápicos incluem agentes alquilantes, tais como tiotepa e ciclofosfamida (Cytoxan®); sulfonatos de alquila, tais como busulfan, improsulfan e piposulfan; aziridinas, tais como benzodopa, carboquona, meturedopa e uredopa; etilenoiminas e metilamelaminas, incluindo altretamina, trietilenomelamina, trietilenofosforamida, trietilenotiofosforamida e trimetilolomelamina; acetogeninas (especialmente bulatacin e bulatacinona); delta-9-tetrahidrocanabinol (dronabinol, MARINOL®); beta-lapacone; lapacol; colcicines; ácido betulinico; camptotecina (incluindo o análogo sintético topotecan (HYCAMTIN®)), CPT-11 (irinotecan, CAMPTOSAR®), acetlcamptotecina, scopolectina e 9-(aminocamptotecina); briostatina; calistatina; CC-1065 (incluindo seus análogos sintéticos adozelesina, carzelesina e bizelesina); podofilotoxina; ácido podofilinico; teniposida; (criptoficinas particularmente a criptoficina 1 e criptoficina 8); dolastatina; duocarmicina (incluindo o análogo sintético, KW-2189 e CB1-TM1); eleuterobina; pancratistatina; sarcodictiina; espongistatina; mostardas de nitrogênio, tais como clorambucil, clornafazina, colofosfamida, estramustina, ifosfamida, mecloretamina, cloridrato óxido de mecloretamina, melfalan, novembiquin, fenesterina, prednimustina, trofosfamida, mostarda de uracila; nitrossuréias, tais como carmustina, clorozotocin, fotemustina, lomustina,

nimustina, ranimustina; antibióticos, tais como os antibióticos de enedina (por exemplo, caliqueamicin, especialmente caliqueamicin gama1I e caliquemicin omega1I; vide, por exemplo, Agnew, *Chem. Intl. Ed. Engl.*, 33: 183-186 (1994); dinemicina, incluindo dinemicina A; esperamicina; bem como neocarzinostatina cromóforo e cromóforos antibióticos de enedina cromoproteína relacionadas), aclacinomisinas, actinomicina, autramicina, azaserina, bleomicinas, cactinomicin, carabicina, carminomicina, carzinofilina, cromomicinas, dactinomicina, daunorrubicina, detorubicina, 6-diazo-5-oxo-L-norleucina, doxorrubicina doxorubicina ADRIAMYCIN® (incluindo, morfolino-doxorubicina, cianomorfolino-doxorubicina, 2-pirrolino-doxorubicina e desoxidoxorubicina), epirubicina, esorubicina, idarubicina, marcelomicina, mitomicinas como, por exemplo mitomicina C, ácido micofenólico, nogalamicina, olivomicinas, peplomicina, potfiromicina, puromicina, quelamicina, rodorrubicina, estreptonigrina, estreptozocina, tubercidina, ubenimex, zinostatina, zorubicina; antimetabólitos, tais como metotrexato, e 5-fluorouracil (5-FU); análogos de ácido fólico, tais como denopterin, metotrexato, pteropterin, trimetrexato; análogos de purina, tais como fludarabina, 6-mercaptopurina, tiamiprina, tioguanina; análogos de pirimidina, tais como ancitabina, azacitidina, 6-azauridina, carmofur, citarabina, dideoxiuridina, doxifluridina, enocitabina, floxuridina; andrógenos, tais como calusterona, propionato de dromostanolona, epitiostanol, mepitiostano, testolactona; anti-adrenais, tais como aminoglutetimida, mitotano, trilostano; reabastecedor de ácido fólico, tal como ácido frolínico; aceglatona; aldofosfamido glicosídeo; ácido aminolevulínico; amsacrina; bestrabucil; bisantreno; edatraxato; defofamina; demecolcina; diaziquona; elfornitina; acetato de eliptínio; epotilona; etoglucídeo; nitrato de gálio; hidroxiuréia; lentinan; lonidamina; maitansinóides, tais como maitansina e ansamitocinas; mitoguazona; mitoxantrona; mopidamol; nitacrina; pentostatina; fenamet; pirarubicina; ácido podofilínico; 2-etilidrazida; procarbazina; PSK®

complexo polissacarídico (JHS Natural Products, Eugene, OR); razoxano; rizoxin; sizofiran; espirogermânio; ácido tenuazônico; triaziquona; 2,2',2"-triclorotrietilamina; tricotecenos (especialmente toxina T-2, verracurin A, roridin A e anguidina); uretano; vindesina (ELDISINE®, FILDESIN®); dacarbazina; manomustina; mitobronitol; mitolactol; pipobroman; gacitosina; arabinosida ("Ara-C"); ciclofosfamida; tiotepa; taxóides, tais como, paclitaxel TAXOL® (Bristol-Myers Squibb Oncology, Princeton, N.J.), formulção de nanopartículas de paclitaxel construidas em albumina ABRAXANETM (American Pharmaceutical Partners, Schaumberg, Illinois), e doxetaxel TAXOTERE® (Rhône-Poulenc Rorer, Antony, France); clorambucil (GEMZAR®); gencitabina; 6-tioguanina (VELBAN®); mercaptopurina; metotrexato; análogos de platina tais como cisplatina e carboplatina; vinblastina; platina; etoposida (VP-16); ifosfamida; mitoxantrona; vincristina (ONCOVIN®); oxaliplatin; leucovovin; vinorelbine (NAVELBINE®); novantrona; edatrexato; daunomicina; aminopterina; ibandronato; inibidor de topoisomerase RFS 2000; difluorometilornitina (DMFO); ácido retinóico; capecitabina (XELODA®); e os sais, ácidos ou derivados farmacêuticamente aceitáveis de quaisquer dos acima; bem como combinações de dois ou mais dos agentes descritos acima como, por exemplo CHOP, uma abreviação para a terapia combinada de ciclofosfamidas, doxorubicina, vincristina, e prednisolona, e FOLFOX, uma abreviação para o regime de tratamento com oxaliplatina (ELOXATINTM) combinada com 5-FU e leucovovina.

São incluídos também nesta definição os agentes anti-hormonais que agem para regular, reduzir, obstruir, ou inibir os efeitos dos hormônios que podem promover o crescimento do câncer, e são freqüentemente forma de tratamento sistêmica, ou de todo o corpo. Podem ser os próprios hormônios. Os exemplos incluem antiestrógenos e os moduladores seletivos do receptor do estrógeno (SERMs), incluindo, por exemplo, tamoxifeno (incluindo o

tamoxifeno NOLVADEX®), raloxifeno (EVISTA®), droloxifeno, 4-hidroxitamoxifeno, trioxifeno, keoxifeno, LY117018, onapristona, e toremifeno (FARESTON®); anti-progesteronas; reguladores supressores de receptor de estrógeno (ERDs); agentes que funcionam para suprimir o s ovários, por exemplo, hormônio agonista liberador de hormônio luteinizante (LHRH) tais como os acetatos de leuprolida LUPRON® e ELIGARD®, acetato de goserelina, acetato de buserelina e tripterelina; outros anti-andrógenos tais como a flutamida, nilutamida e a bicalutamida; e inibidores da aromatase que inibem enzima aromatase, que regula a produção do estrógeno nas glândulas adrenais como, por exemplo, 4(5)-imidazoles, aminoglutetimida, acetato de megestrol (MEGASE®), exemestane (AROMASIN®), formestanie, fadrozole, vorozole (RIVISOR®), letrozole (FEMARA®), e anastrozole (ARIMIDEX®). Além disso, tal definição de agentes quimioterápicos inclui bisfosfonatos tais como o clodronato (por exemplo, o BONEFOS® ou o OSTAC®), etidronato (DIDROCAL®), NE-58095, ácido zoledrônico / zoledronate (ZOMETA®), alendronato (FOSAMAX®), pamidronato (AREDIA®), tiludronato (SKELID®) ou risedronato (ACTONEL®); bem como a troxacitabina (um 1,3-dioxolane análogo nucleosídeo da citosina); os oligonucleotídeos antisense, particularmente aqueles que inibem a expressão dos genes da via de sinalização, implicando na proliferação aberrante da célula como, por exemplo, PKC-alfa, Raf, H-Ras e o receptor do fator de crescimento epidermal (EGF-R); vacinas tais como vacina THERATOPE® e vacinas de terapia gênica, por exemplo, vacina ALLOVECTIN®, vacina LEUVECTIN® e vacina VAXID®; inibidor da topoisomerase 1 (por exemplo, LURTOTECAN®); rmRH (por exemplo, ABARELIX®); ditosilato do lapatinib (um ErbB-2 e um EGFR molécula pequena inibidoras da quinase também conhecida como GW572016); e os sais, ácidos ou derivados farmaceuticamente aceitáveis de quaisquer dos acima.

"Agente inibidor do crescimento", da forma utilizada no presente,

designa o composto ou composição que inibe o crescimento celular, especialmente da célula cancerosa que expresse a molécula alvo *in vitro* ou *in vivo*. Desta forma, o agente inibidor do crescimento pode reduzir significativamente o percentual de células que expressam a molécula alvo na fase S. Exemplos de agentes inibidores do crescimento incluem agentes que bloqueiam o progresso do ciclo celular (em local diferente da fase S), tais como agentes que induzem a suspensão de G1 e a suspensão da fase M. Bloqueadores clássicos da fase M incluem as vincas (vincristina e vinblastina), taxanos e inibidores de topo II tais como doxorubicina, epirubicina, daunorubicina, etoposida e bleomicina. Os agentes que suspendem G1 também se difundem para a suspensão da fase S, tais como agentes alquilantes de DNA como tamoxifen, prednisona, dacarbazina, mecloretamina, cisplatina, metotrexato, 5-fluorouracil e ara-C. Informações adicionais podem ser encontradas em *The Molecular Basis of Cancer*, Mendelsohn e Israel, eds., Capítulo 1, intitulado *Cell Cycle Regulation, Oncogenes and Antineoplastic Drugs* de Murakami *et al* (WB Saunders: Filadélfia, 1995), especialmente pág. 13. Os taxanos (paclitaxel e docetaxel) são os dois fármacos anti-neoplásicos derivados da árvore teixos. Docetaxel (TAXOTERE ®, Rhone-Poulenc Rorer), obtidas a partir de teixos Europeu, é um análogo semi-sintético do paclitaxel (Taxol ®, Bristol-Myers Squibb). Docetaxel e paclitaxel promovem a montagem dos microtúbulos de dímeros de tubulina e estabiliza os microtúbulos, impedindo despolimerização, o que resulta na inibição da mitose nas células.

"Doxorrubicina" é um antibiótico antraciclina. O nome completo do produto químico é doxorrubicina (8S-cis)-10-[(3-amino-2, 3, 6-trideoxi-α-L-lixo-hexapiranosil)oxi]-7, 8, 9, 10-tetrahidro-6, 8, 11-trihidroxi-8-(hidroxiacetíl)-1-metoxi-5, 12-naftacenediona.

O termo "pró-droga", da forma utilizada no presente pedido, designa uma forma precursora ou derivada de substância farmacêuticamente

ativa que é menos citotóxica para células tumorais em comparação com a droga parental e é capaz de ser enzimaticamente ativada ou convertida na forma parental mais ativa. Vide, por exemplo, Wilman, *Prodrugs em Cancer Chemotherapy, Biochemical Society Transactions*, 14, págs. 375-382, 615a Reunião de Belfast (1986) e Stella *et al., Prodrugs: A Chemical Approach to Targeted Drug Delivery, Directed Drug Delivery*, Borchardt *et al.*, (ed.), págs. 247-267, *Human Press* (1985). As pró-drogas de acordo com a presente invenção incluem, mas não se limitam a, pró-drogas que contêm fosfato, pró-drogas que contêm tiofosfato, pró-drogas que contêm sulfato, pró-drogas que contêm peptídeos, pró-drogas modificadas com D-aminoácidos, pró-drogas glicosiladas, pró-drogas que contêm beta-lactama, pró-drogas que contêm fenoxiacetamida opcionalmente substituída ou pró-drogas que contêm fenilacetamida opcionalmente substituída, 5-fluorocitosina e outras pró-drogas de 5-fluorouridina que podem ser convertidas na droga livre citotóxica mais ativa. Exemplos de drogas citotóxicas que podem ser derivadas em forma de pró-droga para uso na presente invenção incluem, mas sem limitar-se a, os agentes quimioterápicos descritos acima.

Para o tratamento de artrite reumatóide ("RA"), o paciente pode ser tratado com um anticorpo da invenção em conjunto com qualquer uma ou mais das seguintes drogas: DMARDS (drogas anti-reumáticas modificadoras da doença (tais como metotrexato)), NSAI ou NSAID (drogas antiinflamatórias não-esteroidais), Humira™ (adalimumab; Abbott Laboratories), Arava® (leflunomida), Remicade® (infliximab; Centocor Inc. de Malvern PA, Estados Unidos), Enbrel (etanercept; Immunex, WA, Estados Unidos), inibidores de COX-2. As DMARDs comumente utilizadas em RA são hidroxicloroquina, sulfasalazina, metotrexato, leflunomida, etanercept, infliximab, azatioprina, D-penicilamina, Gold (oral), Gold (intramuscular), minociclina, ciclosporina e imunoadsorção de proteína A de estafilococo. Adalimumab é um anticorpo

monoclonal humano que se liga a TNF-γ. Infliximab é um anticorpo monoclonal quimérico que se liga ao TNF. Etanercept é uma proteína de fusão de "imunoadesina" que consiste da porção extracelular de ligação do ligante do receptor humano de fator de necrose tumoral de 75 kD (p75) (TNFR) ligado à porção Fc de um IgG1 humano. Para o tratamento convencional de RA, vide, por exemplo, *Guidelines for the Management of Rheumatoid Arthritis*, *Arthritis & Rheumatism* 46 (2): 328-346 (fevereiro de 2002). Em um exemplo de realização específico, o paciente de RA é tratado com um anticorpo anti-CD20 de acordo com a presente invenção em conjunto com metotrexato (MTX). Um exemplo de dosagem de MTX é de cerca de 7,5 a 25 mg/kg/semana. MTX pode ser administrado via oral e subcutânea.

Para o tratamento de espondilite anquilosante, artrite psoriática e doença de Crohn, o paciente pode ser tratado com um anticorpo da invenção em conjunto, por exemplo, com Remicade® (infliximab; da *Centocor Inc.* de Malvern PA, Estados Unidos), e/ou Enbrel (etanercept; Immunex WA, Estados Unidos).

Para o tratamento da SLE, o paciente pode ser tratado com um anticorpo da invenção em conjunto com, por exemplo, uma alta dose de corticosteróides e/ou ciclofosfamida (HDCC).

Para o tratamento de psoríase, os pacientes podem receber um anticorpo da presente invenção em conjunto com tratamentos tópicos, tais como esteróides tópicos, antralina, calcipotrieno, clobetasol e tazaroteno, ou com terapias de metotrexato, retinóides, cicloesporina, PUVA e UVB. Em uma realização, o paciente com psoríase é tratado com o anticorpo da invenção de maneira seqüencial ou simultânea com a ciclosporina.

Molécula "isolada" de ácido nucléico é uma molécula de ácido nucléico que é identificada e separada de pelo menos uma molécula de ácido nucléico contaminante com a qual normalmente está associada na fonte natural do ácido nucléico que codifica o anticorpo. Molécula de ácido nucléico isolada é

diferente da forma na qual é encontrada na natureza. As moléculas de ácido nucléico isoladas são, portanto, diferenciadas da molécula de ácido nucléico existente em células naturais. Entretanto, molécula de ácido nucléico isolada inclui molécula de ácido nucléico contida em células que normalmente expressam o anticorpo no qual, por exemplo, a molécula de ácido nucléico "isolada" está em um sítio cromossômico diferente de células naturais.

A expressão "seqüências de controle" designa seqüências de DNA necessárias para a expressão da seqüência de codificação operacionalmente ligada em um organismo hospedeiro específico. As seqüências de controle que são apropriadas para procariotos, por exemplo, incluem promotor, opcionalmente seqüência operadora, e sítio de ligação de ribossomos. As células eucarióticas são conhecidas por utilizarem promotores, sinais de poliadenilação e acentuadores (enhancers).

A "variante" ou "mutante" de um polipeptídeo inicial ou de referencia (por exemplo, um anticorpo fonte ou seu(s) domínio(s) variável(eis)/CDR(s)), tal como uma proteína de fusão (polipeptídeo) ou um polipeptídeo heterólogo (heterólogo de um fago), é um polipeptídeo que: 1) tem uma seqüência aminoácido diferente do polipeptídeo inicial ou polipeptídeo de referência e 2) foi derivado de um polipeptídeo inicial ou de referência, quer através da mutagênese de polipeptídeo naturais ou artificiais (antrópica). Tais variantes incluem, por exemplo, deleções dos, e/ou inserções nos, e/ou substituições dos resíduos na seqüência de aminoácidos do polipeptídeo de interesse. Por exemplo, um polipeptídeo de fusão da invenção produzido usando um oligonucleotídeo compreendendo um conjunto de códons restrito que codifica uma seqüência com um aminoácido variante (no que diz respeito aos aminoácidos encontrados nas posições correspondentes de um anticorpo fonte / fragmento de ligação ao antígeno) seriam um polipeptídeo variante com relação a um anticorpo fonte e/ou fragmento de ligação ao antígeno e/ou um

CDR. Assim, um CDR variante refere-se a um CDR que possuí uma seqüência variante com relação a seqüência do polipeptídeo inicial ou de referência (como o de um anticorpo fonte / fragmento de ligação ao antígeno e/ou CDR). Um variante de aminoácido, neste contexto, refere-se a um aminoácido diferente do aminoácido na posição correspondente em uma seqüência de polipeptídeo inicial ou de referência (como o de um anticorpo fonte / fragmento de ligação ao antígeno e/ou CDR). Qualquer combinação de deleções, inserções, substituições pode ser realizada para se chegar à construção da variante ou mutante final, desde que este tenha as características funcionais desejadas. Em alguns dos exemplos descritos no presente, as seqüências ligantes possuem mutações pontuais como deleções ou adições. As modificações de aminoácido também podem ocorrer por processos pós-translacionais do polipeptídeo, tal como a alteração no número ou na posição dos locais de glicosilação. Métodos para a produção de seqüências de aminoácidos variantes de polipeptídeos estão descritos na Patente US 5.534.615, expressamente incorporadas ao presente pela referência.

Uma seqüência do "tipo selvagem" ou seqüência de "referência" ou seqüência de um polipeptídeo/proteína do "tipo selvagem" ou seqüência de um polipeptídeo/proteína de "referência", tais como uma proteína da cápside, ou um domínio variável CDR de um anticorpo fonte, pode ser a seqüência de referência a partir do qual a seqüência do polipeptídeo variante é derivada pela introdução de mutações. Em geral, a seqüência do "tipo selvagem" para uma dada seqüência protéica é a seqüência que é mais comum na natureza. Do mesmo modo, uma seqüência genética do "tipo selvagem" é a seqüência de genes que é mais comumente encontrada na natureza. As mutações podem ser introduzidas em um gene do "tipo selvagem" (e, portanto, que codifica as proteínas), tanto por processos naturais quanto por processos induzidos pelo homem. Os produtos de tais processos são formas "variantes" ou "mutantes"

do gene ou proteína do "tipo selvagem" original.

Uma "variedade" de uma substância, como um polipeptídeo ou polinucleotídeo da invenção, como utilizado no presente, refere-se geralmente a uma coleção de dois ou mais tipos ou formas da substância. Há dois ou mais tipos ou formas de uma substância se duas ou mais das substâncias se diferem uma das outras no que diz respeito a uma característica particular, como um aminoácido variante encontrado em uma determinada posição de aminoácido. Por exemplo, existe uma variedade de polipeptídeos da invenção, se houver dois ou mais polipeptídeos da invenção que são substancialmente o mesmo, ou são idênticos nas seqüências exceto pela seqüência de um CDR variante ou exceto por um variante de aminoácido em uma posição de aminoácido altamente diversificada e acessível ao solvente. Em outro exemplo, existe uma variedade de polinucleotídeo da invenção, se houver dois ou mais polinucleotídeos da invenção que são basicamente os mesmos ou idênticos na seqüência exceto pela seqüência que codifica um CDR variante ou exceto por variante de aminoácido em uma posição de aminoácido altamente diversificada e acessível ao solvente.

A invenção fornece um novo método para produzir e isolar polipeptídeos que ligam a um antígeno alvo, tais como anticorpos ou fragmentos ligantes de antígenos, que pode ter uma alta afinidade para um antígeno selecionado. Uma variedade de diferentes polipeptídeos ligantes é preparada por mutação (diversificação) em uma ou mais posições de aminoácidos selecionadas em um domínio variável de cadeia leve e/ou pesada do anticorpo fonte com um conjunto de códons restrito para gerar uma biblioteca de polipeptídeos ligante com aminoácidos variantes em, pelo menos, uma seqüência de CDR, no qual o número de tipos de aminoácidos variantes é mantido a um nível mínimo (ou seja, 19 ou menos, 15 ou menos, 10 ou menos, 8 ou menos, 6 ou menos, 4 ou menos, ou 2, mas, em geral, pelo menos, 2). As

posições de aminoácidos incluem aquelas que são acessíveis ao solvente, por exemplo, como determinado pela análise estrutural de um anticorpo fonte e/ou que são altamente diversificados e/ou polipeptídeos de imunoglobulinas de ocorrência natural. Outra vantagem oferecida pela natureza limitada da diversificação da invenção é que outras posições de aminoácidos adicionais que não aquelas altamente diversificadas e/ou acessíveis ao solvente também pode ser diversificadas, de acordo com a necessidade ou desejo do profissional; exemplos destes exemplos de realização estão descritas no presente.

As posições dos aminoácidos que são acessíveis ao solvente e altamente diversificadas, em certos exemplos de realização são aquelas nos domínios variáveis da região CDR do anticorpo selecionados de entre o grupo constituído por CDRL1, CDRL2, CDRL3, CDRH1, CDRH2, CDRH3, e misturas destes. Posições de aminoácidos são cada mutante utilizando um conjunto de códons restrito que codifica um número limitado de aminoácidos, a escolha dos aminoácidos geralmente é independente dos aminoácidos que ocorrem comumente em cada posição. Em alguns exemplos de realização, quando uma posição acessível ao solvente ou altamente diversificada em uma região CDR é mutada, um conjunto de códons é selecionado para codificar a partir de 2 a 10, de 2 a 8, de 2 a 6, de 2 a 4, e/ou apenas 2 aminoácidos. Em alguns exemplos de realização, quando uma posição acessível ao solvente ou altamente diversificada em uma região CDR é mutada, um conjunto de códons é selecionado para codificar a partir de 2 a 19, 2 a 15, 2 a 10, de 3 a 9, de 4 a 8, e/ou de 5 a 7 aminoácidos. Em alguns exemplos de realização, um conjunto códon codifica pelo menos 2, mas 19 ou menos, 15 ou menos, 10 ou menos, 8 ou menos, 6 ou menos, 4 ou menos aminoácidos. As seqüências de CDR também podem ser diversificadas, variando no comprimento. Por exemplo, para o CDRH3, regiões variantes de CDRH3 que podem ser geradas têm diferentes comprimentos e/ou são aleatorizadas nas posições selecionadas

usando um conjunto de códons restrito.

A diversidade da biblioteca dos polipeptídeos contendo variantes de CDRs é elaborada usando um conjunto de códon que codifica apenas um número limitado de aminoácidos como, por exemplo, uma quantidade mínima, mas suficiente de variedade de seqüências é introduzida em um CDR. O número de posições mutantes no CDR é minimizado e os aminoácidos variantes em cada posição são concebidos de forma a incluir um número limitado de aminoácidos, independente dos aminoácidos considerados como de ocorrência comum nas posições nos CDRs conhecidos ou de ocorrência natural. Em um exemplo de realização específico, um único anticorpo, incluindo pelo menos um CDR, é utilizado como anticorpo fonte. É surpreendente que uma biblioteca de domínio variável de anticorpos possuindo diversidade nas seqüências e no tamanho possa gerar utilizando um único anticorpo fonte como modelo e atingindo uma variedade de posições específicas utilizando um número limitado de substituições de aminoácidos não convencionais.

ELABORAÇÃO DA DIVERSIDADE DOS DOMÍNIOS VARIÁVEIS DE ANTICORPOS

Em um aspecto da invenção, são geradas bibliotecas de alta qualidade de domínios variáveis de anticorpos. As bibliotecas têm a diversidade das seqüências restringidas das diferentes seqüências CDR, por exemplo, a diversidade dos domínios variáveis de anticorpos. As bibliotecas incluem domínios variáveis de anticorpos de alta afinidade de ligação para um ou mais antígenos, incluindo, por exemplo, DR5 e HER-2 humanos. A diversidade na biblioteca é concebida por selecionar posições de aminoácido que são acessíveis ao solvente e altamente diversificadas, em um único anticorpo fonte e mutando as posições deste em, pelo menos, um CDR usando um conjunto de códons restrito. O conjunto de códons restrito pode, em certos exemplos de realização, codificar menos de 19, 15, 10, 8, 6, 4 aminoácidos ou codificar apenas 2 aminoácidos.

Um anticorpo fonte é o anticorpo 4D5 humanizado, mas os métodos para a diversificação pode ser aplicado a outros anticorpos fonte cuja seqüência é conhecida. Um anticorpo fonte pode ser um anticorpo de ocorrência natural, anticorpo sintético, anticorpos recombinante, anticorpo humanizado, anticorpo derivados de linhagem germinal, anticorpo quimérico, anticorpo maturado por afinidade ou fragmento ligante de antígeno. Os anticorpos podem ser obtidos a partir de uma variedade de espécies de mamíferos, incluindo seres humanos, camundongos e ratos. Em alguns exemplos de realização, um anticorpo fonte é um anticorpo que é obtido após uma ou mais etapas de seleção por afinidade inicial, mas antes de uma(algumas) etapa(s) de maturação por afinidade. Um anticorpo fonte pode ser selecionado ou modificado para ser fornecido por alta produtividade e estabilidade quando produzido em cultura de células.

O anticorpo 4D5 é um anticorpo humanizado específico para um antígeno associado ao câncer conhecido como HER-2 (erbB2). O anticorpo inclui domínios variáveis tendo a região estrutural de consenso; algumas poucas posições foram revertidas para a seqüência do camundongo durante o processo para aumentar a afinidade do anticorpo humanizado. A seqüência e a estrutura cristalina do anticorpo 4D5 humanizado estão descritas no Patente US 6.054.297, Carter *et al*, PNAS 89:4285 (1992), a estrutura cristalina é exibida em J Mol. Biol. 229:969 (1993) e *on-line* em http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/mmdb/mmdbsrv.cgi?form=6&dB=t&Dopt=s&uid=990, http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/mmdb/mmdbsrv.cgi?form=6&dB=t&Dopt=s&uid=991, e http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/mmdb/mmdbsrv.cgi?form=6&db=t&Dopt=s&uid = 992.

Um critério para a produção de uma diversidade nos domínios

variáveis de anticorpo é mutando os resíduos nas posições que são acessíveis ao solvente (conforme definido acima). Estas posições são normalmente encontradas nos CDRs, e são tipicamente encontradas no exterior das proteínas. Em certos exemplos de realização, as posições acessíveis ao solvente são determinadas usando coordenadas em modelos 3-dimensionais de um anticorpo, utilizando um programa de computador, tais como o programa InsightII (*Accelrys*, San Diego, Califórnia). As posições acessíveis ao solvente também pode ser determinadas utilizando algoritmos conhecidos no estado da técnica (por exemplo, e Lee Richards, *J. Mol. Biol.* 55, 379 (1971) e Connolly, *J. Appl. Cryst.* 16, 548 (1983)). A determinação das posições acessíveis ao solvente pode ser realizada utilizando um *software* adequado para modelagem e obtenção da informação estrutural tri-dimensional da proteína a partir de um anticorpo. O *software* que pode ser utilizado para esses fins inclui SYBYL *Biopolymer Module software* (*Tripos Associates*). Geralmente, em certos exemplos de realização, onde um algoritmo (programa), exija o uso de entrada do parâmetro tamanho, o "tamanho" de uma sonda que é utilizada no cálculo é fixada em cerca de 1,4 Angstrom ou menor. Além disso, a determinação de regiões acessíveis ao solvente utilizando e métodos da área utilizando um *software* para computadores pessoais foram descritos por Pacios ((1994) "*ARVOMOL/CONTOUR: molecular surface areas and volumes on Personal Computers.*" *Comput. Chem.* 18(4):377-386; e (1995). "*Variations of Surface Areas and Volumes in Distinct Molecular Surfaces of Biomolecules.*" *J. Mol. Model.* 1:46-53.)

Em alguns casos, a seleção dos resíduos acessíveis ao solvente é adicionalmente refinada pela escolha dos resíduos acessíveis ao solvente que formam coletivamente uma região contígua mínima, por exemplo, quando o polipeptídeo de referência ou anticorpo fonte está na sua estrutura 3-D enovelada. Por exemplo, como mostrado na Figura 2, uma região contígua

compacta (mínima) é formada por resíduos selecionados para CDRH1/H2/H3/L1/L2/L3 do 4D5 humanizado. Um conjunto de região contígua compacta (mínima) pode incluir apenas um subconjunto (por exemplo, CDRs 2-5) de toda a gama de CDRs, por exemplo, CDRH1/H2/H3/L3. Resíduos acessíveis ao solvente que não contribuem para a formação de tal região e podem opcionalmente ser excluídos da diversificação. O refinamento da seleção por este critério permite ao profissional minimizar, conforme desejado, o número de resíduos a ser diversificado. Por exemplo, o resíduo 28 no H1 pode opcionalmente ser excluído na diversificação uma vez que este está na extremidade da região. No entanto, este critério também pode ser utilizado, sempre que for desejado, para escolher os resíduos a serem diversificados que podem não necessariamente ser considerado acessível ao solvente.

Por exemplo, um resíduo que não é considerado acessível ao solvente, mas forma uma região contígua na estrutura 3-D enovelada com outros resíduos que são considerados acessíveis ao solvente talvez selecionado para diversificação. Um exemplo disto é o CDRL1-29. Seleção de tais resíduos será evidente para um especialista na técnica, e a sua adequação também pode ser determinada empiricamente e de acordo com as necessidades e desejos dos técnicos hábeis.

As posições acessíveis ao solvente identificada a partir da estrutura cristalina do anticorpo 4D5 humanizado para cada CDR são as seguintes (posição dos resíduos de acordo com Kabat):

CDRL1: 28, 30, 31,32

CDRL2: 50, 53

CDRL3: 91, 92, 93, 94, 96

CDRH1: 28, 30, 31,32, 33

CDRH2: 50, 52, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58.

Além disso, em alguns exemplos de realização, o resíduo 29 do

CDRL1 também pode ser selecionado com base na sua inserção em uma região contígua que inclua outro resíduo acessível para solvente. Todos ou um subconjunto de posições acessível ao solvente estabelecido acima pode ser diversificado nos termos dos métodos e composições da invenção. Por exemplo, em alguns exemplos de realização, apenas as posições 50, 52, 52, 53-56, e 58 são aleatorizadas no CDRH2.

Outro critério para selecionar posições a serem mutadas, são as posições que revelam variabilidade na seqüência de aminoácidos quando comprado com as seqüências de um anticorpo conhecido e/ou natural. Uma posição altamente diversificada refere-se a uma posição de aminoácido localizado na região variável da cadeia leve ou pesada que possua um número de aminoácidos diferentes do representado na posição de aminoácido das seqüências de aminoácidos quando é comparado com o anticorpo ou fragmento ligante conhecido e/ou natural. As posições altamente diversificadas podem estar na região do CDR. As posições de CDRH3 são todas consideradas altamente diversificadas. Em certos exemplos de realização, os resíduos de aminoácidos são altamente diversificados, se tiverem de cerca de 2 a 19 (embora os números possam variar conforme descrito no presente) possíveis variações diferentes de resíduos de aminoácidos em tal posição.

Em um aspecto, a identificação de posições altamente diversificadas em anticorpos conhecidos e/ou de ocorrência natural é facilitada pelos dados fornecidos por Kabat, *Sequences of Proteins of Immunological Interest* (*National Institutes of Health*, Bethesda, Md, 1987 e 1991). Um banco de dados baseado na Internet localizado no endereço http//:www.bioinf.org.uk.abs.structures.html oferece uma extensa coleção e alinhamentos das seqüências de cadeia leve (http//:www.biomf.org.uk.abs.lc.align) e cadeia pesada (http//:www.bioinf.org.uk.abs.hc.align) e facilita a determinação das posições

altamente diversificadas, nestas seqüências. A diversidade nas posições acessível ao solvente do anticorpo 4D5 humanizado nas cadeias leves e pesadas conhecidas e/ou de ocorrência natural é exibida nas Figuras 3 e 4.

Em um aspecto da invenção, os resíduos altamente diversificados e acessíveis ao solvente em pelo menos um, dois, três, quatro, cinco ou todos os CDRs selecionados do grupo constituído por CDRL1, CDRL2, CDRL3, CDRH1, CDRH2, CDRH3, e suas misturas são mutantes (isto é, aleatorizados utilizando um conjunto de códons restrito como definido no presente). Por exemplo, uma população de polipeptídeos pode ser gerada pela diversificação de pelo menos, um resíduo acessível ao solvente e/ou altamente diversificado no CDRL3 e CDRH3 utilizando um conjunto de códon restrito. Desta forma, a invenção fornece um grande número de novas seqüências de anticorpos formados pela substituição, de pelo menos uma posição acessível ao solvente e altamente diversificada de, pelo menos, um CDR do domínio variável do anticorpo fonte com aminoácidos codificados por um códon restrito. Por exemplo, uma variante de CDR ou domínio variável de anticorpo pode representar uma variante de aminoácido em uma ou mais posições dos aminoácidos 28, 30, 31, 32, 33, e/ou 34 do CDRH1; e/ou em uma ou mais posições dos aminoácidos 50, 52, 52, 53, 54, 55, 56 e/ou 58 do CDRH2; e/ou em uma ou mais posições dos aminoácidos 95-100, 100a, 100b, e 100c do CDRH3; e/ou em uma ou mais posições dos aminoácidos 28, 29, 30 e/ou 31 do CDRL1; e/ou em uma ou mais posições dos aminoácidos 50 e/ou 53 no CDRL2; e/ou em uma ou mais posições dos aminoácidos 91, 92, 93, 94, 95 e/ou 96 no CDRL3. Em outro exemplo, uma variante de CDR ou domínio variável de anticorpo pode constar de um variante de aminoácido em uma ou mais posições dos aminoácidos 28, 30, 31, 32, e/ou 33 do CDRH1; e/ou em uma ou mais posições dos aminoácidos 50, 52, 53, 54, 56 e/ou 58 do CDRH2; e/ou em uma ou mais posições dos aminoácidos 95-100, 100a, 100b e 100c do

CDRH3; e/ou em uma ou mais posições dos aminoácidos 28, 29, 30 e/ou 31 do CDRL1; e/ou em uma ou mais posições dos aminoácidos 50 e/ou 53 no CDRL2; e/ou em uma ou mais posições dos aminoácidos 91, 92, 93, 94 e/ou 96 no CDRL3. Os aminoácidos variantes nestas posições são codificados pelo conjunto de códons restrito, tal como descrito no presente.

Tal como foi discutido anteriormente, os variantes de aminoácidos são codificados por um conjunto de códons restrito. Um conjunto de códons é um conjunto de diferentes seqüências de tríades de nucleotídeos utilizados para codificar o grupo de aminoácido variante desejado. A síntese dos oligonucleotídeos com a "degenerescência" de nucleotídeos selecionados em determinadas posições é bem conhecida no estado da técnica. Tais conjuntos de oligonucleotídeos com determinados conjuntos de códons podem ser sintetizados usando sintetizadores de ácidos nucléicos comerciais (disponível por, por exemplo, *Applied Biosystems*, Foster City, Califórnia), ou podem ser obtidos comercialmente (por exemplo, pela *Life Technologies*, Rockville, MD). Por isso, um conjunto de oligonucleotídeos sintetizados tendo um conjunto de códons específico irá incluir normalmente uma variedade de oligonucleotídeos com seqüências diferentes, as diferenças estabelecidas pelo conjunto de códons dentro da seqüência global. Oligonucleotídeos, tal como utilizado na presente invenção, têm seqüências que permitem a hibridização de um molde de um ácido nucléico do domínio variável e também pode, mas não necessariamente, incluir locais úteis para o uso de enzimas de restrição, por exemplo, para fins de clonagem.

Em um aspecto, o repertório restrito de aminoácidos destinados a ocupar um ou mais das posições acessíveis ao solvente ou altamente diversificadas nos CDRs do anticorpo 4D5 humanizado são determinados (com base no desejo do técnico praticante, que pode ser baseadas em um número qualquer de critérios, incluindo aminoácidos específicos para determinadas

posições desejadas, ausência de aminoácido(s) específico(s) em determinadas posições desejada, tamanho da biblioteca desejada, característica de procura dos ligantes ao antígeno, etc.)

CDR3s de cadeia pesada (CDRH3s) em anticorpos conhecidos têm diversas seqüências, conformações estruturais, e comprimentos. Os CDRH3s são freqüentemente encontrados no meio da área de ligação com o antígeno e freqüentemente participam no contato com o antígeno. A elaboração do CDRH3 pode assim ser desenvolvida separadamente do que o de outras CDRs, pois pode ser difícil prever a conformação estrutural do CDRH3 e a diversidade de aminoácido nesta região é especialmente conhecida em diversos anticorpos. De acordo com a presente invenção, o CDRH3 é elaborado para gerar diversidades nas posições específicas dentro do CDRH3, por exemplo, nas posições 95, 96, 97, 98, 99100, 100a, 100b, e 100c (por exemplo, de acordo com a numeração de Kabat no anticorpo 4D5). Em alguns exemplos de realização, a diversidade também é gerada pelo pela variação do comprimento de CDRH3 usando um conjunto de códons restrito. A diversidade do comprimento pode ser de qualquer amplitude determinada empiricamente por estar adequada para gerar uma população de polipeptídeos que contêm grandes proporções de proteínas ligantes de antígenos. Por exemplo, os polipeptídeos compreendendo o variante CDRH3 podem ser gerados com a seqüência X1-X2-X3-X4-X5-(X6)n-X7-X8-X9-DY (SEQ IS No: 4), no qual, X1-X9 são aminoácidos codificados pelo conjunto de códons restrito, e n é de comprimentos diferentes, por exemplo, n=1-11, 5-11 ou 7-11. Outros exemplos de possíveis valores de n são: 1,2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 e 11. Realizações ilustrativas de oligonucleotídeos que pode ser utilizados para fornecer uma variedade no comprimento da seqüência CDRH3 incluem aqueles indicados na Figura 9A-9D, Figura 20A-L e Figura 23.

Contempla-se que a diversidade na seqüência das bibliotecas

criadas pela introdução de variantes de aminoácidos, em um CDR específico, por exemplo, CDRH3, pode ser aumentada através da combinação do CDR variante com outros CDRs que possuem variações de outras regiões do anticorpo, especificamente em outras CDRs de ambas as seqüências variáveis da cadeia leve e pesada. Também é contemplado que as seqüências de ácidos nucléicos que codificam membros deste conjunto podem ser adicionalmente diversificados pela introdução de outros aminoácidos variantes nas CDRs, de ambas as seqüências variáveis da cadeia leve e pesada, através de conjuntos de códons. Desta forma, em um exemplo de realização, as seqüências CDRH3 dos polipeptídeos de fusão que se ligam ao antígeno alvo podem ser combinadas com seqüências CDRL3, CDRH1 ou CDRH2 diversificadas, ou qualquer combinação de CDRs diversificadas.

Deve ser notado que, em alguns casos os resíduos da região estrutural podem ser variados com relação à seqüência de um anticorpo fonte ou fragmento ligante ao antígeno, por exemplo, para refletir a seqüência consenso ou para melhorar a estabilidade ou exibição. Por exemplo, os resíduos da cadeia pesada na região estrutural 49, 93, 94 ou 71 podem ser variados. O resíduo 93 da cadeia pesada da região estrutural podem ser alanina ou serina (que é a seqüência de aminoácido de consenso humano nesta posição.). O resíduo 94 da cadeia pesada da região estrutural podem ser alterados de modo a refletir a seqüência consenso da região estrutural a partir da treonina a arginina ou lisina. Outro exemplo de resíduos da região estrutural que pode ser alterado é o resíduo 71 da cadeia pesada da região estrutural, que é R em cerca de 1970 polipeptídeos, V, em cerca de 627 polipeptídeos, e A em cerca de 527 polipeptídeos, como encontrado no banco de dados de Kabat. O resíduo 49 da cadeia pesada da região estrutural podem ser ou alanina glicina. Além disso, opcionalmente, os 3 aminoácidos N-terminal do domínio variável da cadeia pesada podem ser removidos. Na cadeia leve,

opcionalmente, o aminoácido arginina na posição 66 pode ser modificado para glicina. Em um exemplo de realização, o resíduo 93 na cadeia pesada da região estrutural é alanina e o resíduo 94 é arginina.

Em um aspecto, a invenção fornece a construção de um vetor para produzir polipeptídeos de fusão que se ligam com afinidade significativa aos ligantes potenciais. Estas construções constam de domínios dimerizáveis que quando presentes em um polipeptídeo de fusão fornece um tendência aumentada para dimerizar as cadeias pesadas para formar dímeros de fragmentos ou porções de anticorpos Fab ou Fab'. Estes domínios de dimerização podem incluir, por exemplo, uma seqüência de dobradiça da cadeia pesada (por exemplo, uma seqüência que inclui TCPPCPAPELLG (SEQ ID No: 5) que podem estar presentes no polipeptídeo de fusão). Os domínios de dimerização nos polipeptídeo de fusão de fagos trazem dois conjuntos de polipeptídeos de fusão unidos (LC/HC-proteína de fago/fragmento (tal como pIII)), permitindo assim a formação de ligações adequadas (como pontes de dissulfeto entre cadeias pesadas) entre os dois conjuntos de polipeptídeos de fusão. O vetor construído contendo tal domínio de dimerização pode ser utilizado para alcançar a exposição divalente do domínio variável de anticorpo, por exemplo, as diversas proteínas de fusão descritas no presente, em um fago. Em certos exemplos de realização, a afinidade intrínseca de cada fragmento de anticorpo monomérico (polipeptídeo de fusão) não é significativamente alterada pela fusão ao domínio de dimerização. Em certos exemplos de realização, a dimerização resulta na exibição de um fago divalente, que fornece um aumento avidez da ligação do fago, com diminuição significativa na taxa dissociação, que pode ser determinada por métodos conhecidos no estado da técnica e como descritos no presente. Os vetores contendo o domínio de dimerização da invenção podem ou não incluir também um códon de parada âmbar após o domínio de dimerização.

A dimerização pode ser variada para se conseguir exibir características diferentes. Os domínios de dimerização podem incluir uma seqüência contendo um resíduo cisteína, uma região de dobradiça de anticorpo de comprimento total, como uma seqüência de dimerização tal como leucina ou seqüência zíper GCN4 ou misturas destas. As seqüências de dimerização são conhecidas no estado da arte, e incluem, por exemplo, a seqüência zíper GCN4 (GRMKQLEDKVEELLSKNYHLENEVARLKKLVGERG) (ID SEQ No: 3). O domínio de dimerização em certos exemplos de realização está localizado na extremidade C-terminal da seqüência do domínio variável ou constante da cadeia pesada e/ou entre a seqüência do domínio variável ou constante da cadeia pesada e em qualquer seqüência do componente da proteína da cápside viral. Um códon de parada âmbar pode também estar presente no ou no final da extremidade C-terminal do domínio de dimerização. Em um exemplo de realização, onde o códon de parada âmbar está presente, o domínio de dimerização codifica pelo menos uma cisteína e uma seqüência de dimerização como um zíper de leucina. Em outros exemplos de realização, onde o códon de parada âmbar não está presente, o domínio de dimerização pode incluir um único resíduo cisteína.

Os polipeptídeos da invenção também podem ser fundidos a outros tipos de polipeptídeos, a fim de adequá-los para a exibição de variantes de polipeptídeos ou fornecer a purificação, seleção ou triagem e detecção do polipeptídeo. Para um exemplo de realização envolvendo a exibição por fago, os polipeptídeos da invenção são fundidos em toda ou parte de uma proteína da cápside viral. Exemplos de proteínas da cápside viral incluem as proteínas pIII, proteína principal da cápside pVIII, Soc, Hoc, gpD, pv1, e variantes destes. Além disso, os polipeptídeos variantes produzidos de acordo com os métodos da invenção podem opcionalmente ser fundidos a um polipeptídeo marcador ou etiquetador como, por exemplo, FLAG, poli-histidina, gD, *c-myc*, B-

galactosidase e similares.

MÉTODOS PARA PRODUÇÃO DE BIBLIOTECAS DE DOMÍNIOS VARIÁVEIS ALEATORIZADOS

Métodos para substituir um aminoácido de escolha em um ácido nucléico modelo são bem estabelecidos no estado da técnica, alguns dos quais estão descritos no presente. Por exemplo, as bibliotecas podem ser criadas para atingir posições acessíveis ao solvente e/ou altamente diversificada em pelo menos uma substituição de aminoácido na região variante de CDR utilizando o método Kunkel. Vide, por exemplo, Kunkel *et al.*, *Methods Enzymol.* (1987), 154:367-382. A produção de seqüências aleatorizadas também está descrita abaixo nos Exemplos.

A seqüência de oligonucleotídeos inclui um ou mais dos conjuntos de códons restritos elaborados para diferentes comprimentos de CDRH3 ou para posições acessíveis ao solvente ou altamente diversificadas em um CDR. Um conjunto de códons é um conjunto de diferentes seqüências de tríades de nucleotídeos utilizados para codificar o variante de aminoácidos pretendido. Um conjunto de códons pode ser representado utilizando símbolos para designar um nucleotídeo específico ou misturas equimolares de nucleotídeos como demonstrado a seguir, de acordo com o código IUB. Tipicamente, um conjunto códons é representado por três letras maiúsculas, por exemplo, *KMT*, *TMT* e similares.

CÓDIGO IUB

G guanina

A adenina

T timina

C Citosina

R (A ou G)

Y (C ou T)

M (A ou C)

K (G ou T)

S (C ou G)

W (A ou T)

H (A ou C ou T)

B (C ou G ou T)

V (A ou C ou G)

D (A ou G ou T)

N (A ou C ou G ou T)

Por exemplo, no conjunto de códons TMT, T é o nucleotídeo timina; M podem ser A ou C. Este conjunto de códons pode apresentar vários códons e pode codificar apenas um número limitado de aminoácidos, ou seja, serina e tirosina.

Um conjunto de oligonucleotídeos ou *primer* pode ser sintetizado usando métodos padrões. Um conjunto de oligonucleotídeos pode ser sintetizado, por exemplo, pela síntese em fase sólida, contendo seqüências que representam todas as combinações possíveis de tríades nucleotídicas fornecidas pelo conjunto de códons restrito e que vai codificar o grupo restrito de aminoácidos desejado. A síntese dos oligonucleotídeos com a "degenerescência" de nucleotídeos selecionados em determinadas posições é bem conhecida no estado da técnica. Tais conjuntos de oligonucleotídeos com determinados conjuntos de códons podem ser sintetizados usando sintetizadores de ácidos nucléicos comerciais (disponível por, por exemplo, Applied Biosystems, Foster City, Califórnia), ou podem ser obtidos comercialmente (por exemplo, pela Life Technologies, Rockville, MD). Por isso, um conjunto de oligonucleotídeos sintetizados tendo um conjunto de códons específico irá incluir normalmente uma variedade de oligonucleotídeos com seqüências diferentes, as diferenças estabelecidas pelo conjunto de códons

dentro da seqüência global. Oligonucleotídeos, tal como utilizado na presente invenção, têm seqüências que permitem a hibridização para um CDR (por exemplo, como os contidos em um domínio variável) de um molde de um ácido nucléico e também pode incluir locais úteis para o uso de enzimas de restrição, por exemplo, para fins de clonagem.

Em um método, as seqüências de ácidos nucléicos que codificam variantes de aminoácidos podem ser criadas por mutagênese mediada por oligonucleotídeo de uma seqüência de ácidos nucléicos que codifica um polipeptídeo fonte ou modelo tais como os domínios variáveis do anticorpo 4D5. Esta técnica é bem conhecida no estado da técnica, como descrito por Zoller *et al. Nucleic Acids Res.* 10:6487-6504 (1987). Resumidamente, A codificação das seqüências de ácidos nucléicos dos aminoácidos variantes é criada pela hibridização de um conjunto de oligonucleotídeos que codifica o conjunto de códons restrito desejado a um DNA molde, no qual o molde é uma forma de plasmídeo de fita simples contendo uma seqüência molde de ácidos nucléicos da região variável. Após a hibridização, o DNA polimerase é usado para sintetizar toda uma segunda fita complementar do molde que irá, assim, integrar o *primer* de oligonucleotídeo, e irá conter o conjunto de códons restrito, como o fornecido pelo conjunto de oligonucleotídeo. Ácidos nucléicos que codificam outras moléculas fonte ou molde são conhecidos ou podem ser facilmente determinados.

Geralmente, oligonucleotídeos de pelo menos 25 nucleotídeos de comprimento são utilizados. Um oligonucleotídeo ótimo terá pelo menos de 12 a 15 nucleotídeos que são totalmente complementares ao molde de ambos os lados do(s) nucleotídeo(s) que codifica(m) a(s) mutação(ões). Isto garante que o oligonucleotídeo irá hibridizar devidamente a molécula de DNA molde de fita simples. Os oligonucleotídeos são facilmente sintetizados através de técnicas conhecidas no estado da técnica, como o descrito por Crea *et al.*, *Proc. Natl.*

Acad. Sci. USA., 75:5765 (1978).

O molde de DNA (DNA *template*) é gerado pelos vetores que são derivados dos vetores de bacteriófago M13 (os vetores comercialmente disponíveis M13mp18 e M13mp19 são adequados), ou vetores que contêm uma única origem de replicação de fago de fita simples, como descrito por Viera *et al.*, *Meth. Enzymol.*, 153:3 (1987). Assim, o DNA que será mutado pode ser inserido em um destes vetores, a fim de gerar um molde (*template*) de fita simples. A produção de molde de fita simples é descrito nas seções 4.21-4.41 de Sambrook *et al.*, acima.

Para alterar a seqüência do DNA nativo, o oligonucleotídeo é hibridizado por um molde de fita simples nas devidas condições de hibridação. A enzima de polimerização do DNA, geralmente T7 DNA polimerase ou fragmento Klenow da DNA polimerase I, é então adicionada para sintetizar a fita complementar do molde usando o oligonucleotídeo como um *primer* para a síntese. Uma molécula heterodúplice é assim forma de tal forma que uma fita do DNA codifica a forma mutante do gene 1, e a outra fita (o modelo original) codifica as seqüências do gene 1 nativa, inalterada. Esta molécula heterodúplice é então utilizada para modificar uma célula hospedeira adequada, geralmente um procarionte tal como *E. coli* JM101. Após o crescimento das células, elas são semeadas em placas de agarose e selecionadas utilizando um *primer* com oligonucleotídeos marcados radioativamente com um Fosfato-32 para identificar as colônias bacterianas que contêm o DNA mutado.

O método descrito imediatamente acima pode ser modificado de tal forma que seja criada uma molécula homoduplex onde ambas as fitas do plasmídeo possui mutação(ões). As modificações são as seguintes: O oligonucleotídeo de fita simplex é anelado à fita simples do molde, tal como descrito acima. Uma mistura de três desoxirribonucleotídeos,

deoxiriboadenosina (dATP), deoxiriboguanosina (dGTP) e deoxiribotimidina (dTT), é combinada com uma modificação tiodeoxiribocitosina denominada dCTP-(aS) (que pode ser obtida pela Amersham). Essa mistura é adicionada ao complexo oligonucleotídeo-molde. Após a adição da DNA polimerase na mistura, uma fita de DNA idêntica a fita molde exceto pelas bases mutantes é então produzida. Além disso, esta nova fita de DNA irá conter dCTP-(aS) em vez de dCTP, que servirá para protegê-la da digestão com endonuclease de restrição. Após a fita molde do heterodúplice de dupla fita ser cortada com uma enzima de restrição adequada, a fita molde pode ser digerida com a nuclease *ExoIII* ou outra nuclease adequada, passando a região que contém o(s) sítio(s) a ser(em) mutagenizado(s). A reação é, então, parada para deixar uma molécula que é apenas parcialmente fita simples. Um DNA heterodúplice completo de fita dupla é então formado usando a DNA polimerase, na presença de todos os quatro desoxiribonucleotídeos trifosfatos, ATP, e DNA ligase. Esta molécula heterodúplice pode então ser utilizada para modificar uma célula hospedeira apropriada.

Tal como indicado anteriormente a seqüência do conjunto de oligonucleotídeo é de comprimento suficiente para hibridizar o ácido nucléico molde e também pode, mas não necessariamente, incluir sítios de restrição.

O molde de DNA (DNA *template*) pode ser gerado pelos vetores que são derivados dos vetores de bacteriófago M13 ou vetores que contêm uma única origem de replicação de fago de fita simples, como descrito por Viera *et al.*, *Meth. Enzymol.*, 153:3 (1987). Assim, o DNA que será mutado pode ser inserido em um destes vetores, a fim de gerar um molde (*template*) de fita simples. A produção de molde de fita simples é descrito nas seções 4.21-4.41 de Sambrook *et al.*, *supra*.

De acordo com outro método, uma biblioteca pode ser gerada pelo fornecimento de conjuntos de oligonucleotídeos à montante e à jusante,

cada conjunto com uma variedade de oligonucleotídeos com diferentes seqüências, as diferentes seqüências estabelecidas pelo conjunto de códons referidos fornecida no interior da seqüência de oligonucleotídeos. O conjunto de oligonucleotídeos à montante e à jusante, juntamente com uma seqüência de ácidos nucléicos molde do domínio variável, pode ser utilizada em na reação em cadeia da polimerase para gerar uma "biblioteca" de produtos de PCR. Os produtos da PCR podem ser referidos como "cassetes de ácidos nucléicos", e eles podem ser fundidos com outras seqüências de ácidos nucléicos relacionados ou não relacionados, por exemplo, componentes componentes da proteína da cápside viral, domínios de dimerização, utilizando técnicas de biologia molecular estabelecidas.

A seqüência dos *primers* de PCR inclui um ou mais dos conjuntos códons elaborados para as posições acessíveis ao solvente ou altamente diversificadas em uma região CDR. Como descrito acima, um conjunto códons é um conjunto de diferentes seqüências de tríades nucleotídicas utilizadas para codificar os aminoácidos variantes desejados.

O conjunto de oligonucleotídeos pode ser utilizado em uma reação em cadeia da polimerase usando uma seqüência de ácidos nucléicos molde da região variável para a criação de cassetes de ácidos nucléicos. A seqüência de ácidos nucléicos molde da região variável pode ser qualquer porção da seqüência de ácidos nucléicos molde da região variável da cadeia leve ou pesada da imunoglobulina (isto é, seqüências de ácidos nucléicos codificando aminoácidos alvos para substituição). A seqüência de ácidos nucléicos molde da região variável é uma porção de uma molécula de DNA dupla fita tendo a primeira fita de ácido nucléico e a segunda fita complementar de ácido nucléico. A seqüência de ácidos nucléicos molde da região variável contém pelo menos uma porção de um domínio variável e tem pelo menos um CDR. Em alguns casos, seqüência de ácidos nucléicos molde da região

variável contém mais de um CDR. Uma porção à montante e à jusante de uma seqüência de ácidos nucléicos molde da região variável podem ser direcionadas para a hibridação com membros de um conjunto de oligonucleotídeos à montante e um conjunto de oligonucleotídeos à jusante.

Um primeiro oligonucleotídeo de um conjunto de *primer* à jusante pode hibridizar a primeira fita de ácido nucléico e um segundo oligonucleotídeo de um conjunto de *primer* à montante pode hibridizar a segunda fita de ácido nucléico. Os *primers* de oligonucleotídeos podem incluir um ou mais conjuntos de códons serem desenhados para hibridizar uma porção da seqüencia de ácido nucléico molde da região variável. O uso desses oligonucleotídeos pode introduzir dois ou mais conjuntos de códons no produto da PCR (ou seja, os cassetes de ácidos nucléicos). O *primer* de oligonucleotídeo que hibridiza a seqüencia de ácido nucléico molde da região variável que codifica as porções do domínio variável de anticorpos inclui porções que codificam resíduos de CDR que são direcionados para a substituição de aminoácidos.

Os conjuntos de oligonucleotídeos à montante e à jusante também podem ser sintetizados para incluir sítios de restrição na seqüência dos oligonucleotídeos. Estes sítios de restrição podem facilitar a inserção dos cassetes de ácidos nucléicos [isto é, produtos da PCR] em um vetor de expressão tendo as seqüências adicionais do anticorpo. Em certos exemplos de realização, a sítios de restrição são projetados para facilitar a clonagem dos cassetes de ácidos nucléicos sem introduzir as seqüências externas de ácidos nucléicos ou removendo o CDR original ou as seqüências da região estrutural.

Cassetes de ácidos nucléicos podem ser clonados em qualquer vetor de expressão adequado de uma parte ou da totalidade da seqüência da cadeia leve ou pesada contendo a substituição do aminoácido alvo gerada. De acordo com os métodos descritos na invenção, o cassete de ácido nucléico é clonado em um vetor que permite produção de uma parte ou da totalidade da

seqüência da cadeia leve ou pesada fundida a todas ou apenas uma parte de uma proteína da cápside viral (ou seja, a criação de uma proteína de fusão) e exibida na superfície de uma partícula ou célula. Embora vários tipos de vetores sejam disponíveis e podem ser utilizados para a prática desta invenção, vetores de fagomídeos são convenientes, pois eles podem ser construídos com relativa facilidade, e pode facilmente ser amplificados. Vetores fagomídeos geralmente contêm uma variedade de componentes, incluindo promotores, seqüências sinal, genes de seleção fenotípica, sítios de origem de replicação, e outros componentes necessários conhecidos por aqueles hábeis no assunto.

Em outro exemplo de realização, no qual uma combinação de um aminoácido variante específico deve ser expressa, o cassete de ácido nucléico contém uma seqüência que é capaz de codificar a totalidade ou parte do domínio variável da cadeia pesado ou leve, e é capaz de codificar as combinações da variante de aminoácido. Para a produção de anticorpos que contêm estes aminoácidos variantes ou combinações de aminoácidos variantes, como em uma biblioteca, o cassete de ácido nucléico pode ser inserido em um vetor de expressão contendo a seqüência adicional de anticorpos, por exemplo, toda ou parte da região do domínio variável ou constante da cadeia leve e pesada. Estas seqüências de anticorpos adicionais também podem ser fundidas a outras seqüências de ácidos nucléicos, tais como as seqüências que codificam os componentes das proteínas da cápside viral e, por conseguinte, permitem a produção de uma proteína de fusão.

VETORES

Um aspecto da invenção inclui um vetor de expressão replicável constando de ácidos nucléicos que compreende uma seqüência que codifica um gene de fusão, no qual o gene de fusão codifica uma proteína de fusão que compreende uma polipeptídeo contido no CDR (tal como um domínio variável

de anticorpo), ou um domínio variável ou constante de anticorpo, fundidos a totalidade ou parte de uma proteína da cápside viral. Também está incluída uma biblioteca de diversos vetores de expressão replicável que compreende uma variedade de genes de fusão que codificam uma variedade de proteínas de fusão, incluindo uma variedade de polipeptídeos de fusão produzidos com diversas seqüências, como descrito acima. Os vetores podem incluir uma variedade de componentes e pode ser construído de modo a permitir o movimento do domínio variável do anticorpo entre os diferentes vetores e/ou fornecer a exibição das proteínas de fusão em diferentes formatos.

Exemplos de vetores incluem vetores fagos e vetores fagomídeos (que são ilustrado no presente, e descritos em maiores detalhes acima). Um vetor fago geralmente tem uma origem de replicação de fago permitindo a replicação e a formação da partícula do fago. O fago é geralmente um bacteriófago filamentoso, tais como um fago M13, fl, fd, Pf3 ou um derivado destes, ou um fago lambdóide, tais como lambda, 21, phi80, phi81, 82, 424, 434 e etc., ou um derivado destes.

Exemplos de proteínas da cápside viral incluem a proteína da infecciosidade pIII (por vezes também designada p3), proteína principal da cápside pVIII, Soc (T4), Hoc (T4), gpD (de bacteriófago lambda), proteína 6 da cápside secundária do bacteriófago (pVI) (fago filamentosp; *J Immunol Methods*. Dezembro de 1999; 10, 231(I-2):39-51), variantes da proteína (P8) principal da cápside do bacteriófago M13 (*Protein Sci* 9 abril de 2000; (4) :647-54). A proteína de fusão pode ser exibida na superfície de um fago e sistemas de fagos adequados incluem sistemas auxiliadores de fago M13K07, M13R408, M13-VCS, e Phi X 174, pJuFo (*J Virol.* Agosto de 2001; 75(15):7107-13.v), híperfago (*Nat Biotechnol* Jan 2001;19(I):75-8). Em certos exemplos de realização, o auxiliador de fago é M13K07, e as proteínas são as proteínas da cápside do gene III do fago M13. Em certos exemplos de realização, a célula

hospedeira é a *E. coli*, e cepas de *E. coli* deficientes de protease. Vetores, tais como o vetor fth1 (*Nucleic Acids Res.* Maio de 2001 15; 29 (10): E50-0) pode ser útil para a expressão da proteína de fusão.

O vetor de expressão pode também ter uma seqüência de sinal de secreção fundida ao DNA que codifica um polipeptídeo de fusão contendo o CDR (por exemplo, cada subunidade do anticorpo, ou fragmentos destes). Esta seqüência é tipicamente localizada imediatamente ao 5'do gene que codifica a proteína de fusão, e por isso serão transcritas na amino terminal da proteína de fusão. No entanto, em certos casos, tem sido demonstrado que a seqüência sinal está localizada em posições diferentes de 5'do gene que codifica a proteína de ser secretada. Esta seqüência alvo da proteína que se encontram associadas por todo o interior da membrana celular bacteriana. O DNA que codifica a seqüência de sinal pode ser obtido como um fragmento de restrição por endonuclease de um gene que codifica uma proteína que tem uma seqüência sinal. Seqüências sinais adequadas em procariotos podem ser obtidas a partir de genes que codificam, por exemplo, LamB ou OmpF (Wong *et al.*, *Gene*, 68:1931 (1983), MalE, PhoA e outros genes. Em um exemplo de realização, uma seqüência de sinal de procariótico para a prática desta invenção é a seqüência sinal da *E. coli* enterotoxina II termo-lábil (STII), como descrito por Chang *et al.*, *Gene* 55:189 (1987), e/ou malB.

Como indicado acima, um vetor também inclui normalmente um promotor para direcionar a expressão do polipeptídeo de fusão.Promotores mais comumente utilizados em vetores procarióticos incluem o sistema promotor lac Z, promotor da fosfatase alcalina pho A (AP), o promotor de bacteriófago 1PL (promotor sensível à temperatura), promotor tac, promotor de triptofano, promotor de bacteriófago T7. Para descrições gerais dos promotores, consulte a seção 17 de Sambrook *et al. Supra*. Embora estes sejam os promotores mais comumente utilizados, outros promotores

adequados podem ser também utilizados.

O vetor pode também incluir outras seqüências de ácidos nucléicos, por exemplo, seqüências que codificam marcadores gD, epítopos de *c-Myc*, marcadores poli-histidina, proteínas fluorescentes (por exemplo, GFP), ou proteína beta-galactosidase que podem ser úteis na detecção ou purificação da proteína de fusão expressas na superfície da célula ou fago. Seqüências de ácidos nucléicos que codificam, por exemplo, uma marcador gD, fornece também para a seleção positiva ou negativa de células ou vírus que expressam a proteína de fusão. Em alguns exemplos de realização, o marcador gD é fundido a um domínio variável de anticorpo que não é fundido a um componente da proteína da cápside viral. As seqüências de ácidos nucléicos codificando, por exemplo, um marcador poli-histidina, são úteis para a identificação de proteínas de fusão incluindo domínios variáveis de anticorpo que se ligam a um antígeno específico usando a técnica de imuno-histoquímica. Marcadores úteis para a detecção da ligação ao antígeno podem ser ligados tanto a um domínio variável de anticorpo não fundido a um componente da proteína da cápside viral, quanto a um domínio variável de anticorpo fundido a um componente da proteína da cápside viral.

Outro componente útil dos vetores utilizados para a prática desta invenção são os genes de seleção fenotípica. Genes de seleção fenotípica específicos são os genes que codificam proteínas que conferem resistência à antibióticos nas células hospedeiras. Com o objetivo de ilustrar, o gene que confere resistência a ampicilina (*ampr*), e o gene de resistência a tetraciclina (*tetr*) são facilmente empregados para este propósito.

O vetor pode também incluir seqüências de ácidos nucléicos contendo sítios de restrição únicos e códons de parada que podem ser suprimidos. Os sítios de restrição únicos são úteis para transportar os domínios variáveis de anticorpos entre os diferentes vetores e sistemas de expressão,

especialmente úteis para a produção de anticorpos de comprimento total ou fragmentos ligantes de antígenos em culturas de células. Os códons de parada que podem ser suprimidos são úteis para controlar o nível de expressão da proteína de fusão e facilitar a purificação dos fragmentos solúveis de anticorpos. Por exemplo, um códon de parada âmbar pode ser lido como *Gln* em um hospedeiro *supE* para permitir a exibição por fago, em quanto um hospedeiro *não-supE* que é lido como um códon de parada para produzir fragmentos solúveis de anticorpos sem a fusão a uma proteína da cápside do fago. Estas seqüências sintéticas podem ser fundidas a um ou mais domínio variável de anticorpo no vetor.

Por vezes, é benéfico o uso de sistemas de vetor que permitem a codificação de ácidos nucléicos para uma seqüência de anticorpo de interesse, por exemplo, um CDR tendo aminoácidos variantes, que pode ser facilmente removido do sistema de vetor e colocado em outro sistema de vetor. Por exemplo, a sítios de restrição adequados podem ser desenvolvidos em um sistema de vetor para facilitar a remoção da seqüência de ácidos nucléicos que codifica um anticorpo ou domínio variável de anticorpo com os aminoácidos variantes. Aas seqüências de restrição são normalmente escolhidas para serem únicas nos vetores para facilitar a excisão e ligação no novo vetor. Anticorpos ou domínio variável de anticorpo pode então ser expresso por vetores sem as seqüências de fusão externas, tal como as proteínas da cápside viral ou outra seqüência marcadora.

Entre os ácidos nucléicos que codificam o domínio variável ou constante do anticorpo (gene 1) e o componente da proteína da cápside viral (gene 2), pode ser inserido um DNA que codifica um códon de parada, esse códon de terminação inclui UAG (Âmbar), SAU (Ocre) e UGA (Opala). (*Microbiology*, Davis *et al.*, Harper & Row, Nova Iorque, 1980, págs. 237, 245-47 e 374). O códon de terminação ou de parada expresso em uma célula

hospedeira do tipo selvagem resulta na síntese de proteína do gene 1 sem a proteína produzida pelo gene 2 anexada. Entretanto, o crescimento em uma célula hospedeira supressora resultados na síntese de quantidades detectáveis de proteínas fundidas. Estas células hospedeiras supressoras são bem conhecidas e descritas, tais como cepa supressora de *E. coli* (Bullock *et al.*, *BioTechniques* 5:376-379 (1987)). Qualquer método aceitável pode ser utilizado para colocar o códon de terminação no RNAm que codifica o polipeptídeo de fusão.

O códon que pode ser suprimido pode ser inserido entre o primeiro gene que codifica um domínio variável ou constante do anticorpo, e um segundo gene que codifica pelo menos uma parte da proteína da cápside do fago. Alternativamente, o códon de terminação que pode ser suprimido pode ser inserido de maneira adjacente ao sítio de fusão através da substituição da última tríade de aminoácido no domínio variável do anticorpo ou do primeiro aminoácido na proteína da cápside do fago. O códon de terminação que pode ser suprimido pode estar localizado na, ou após a extremidade C-terminal de um domínio de dimerização. Quando o plasmídeo contendo o códon que pode ser suprimido é cultivado em uma célula hospedeira supressora, resulta na produção detectável de um polipeptídeo de fusão contendo o polipeptídeo e a proteína da cápside. Quando o plasmídeo é cultivado em uma célula hospedeira não-supressora, o domínio variável de anticorpo é substancialmente sintetizado sem a fusão da proteína da cápside do fago devido ao terminador inserido na tríade supressora UAG, UAA ou UGA. Nas células não supressoras o domínio variável de anticorpo é sintetizado e secretado pela célula hospedeira, devido à ausência da fusão da proteína da cápside do fogo com outra proteína ancorada a membrana desta célula hospedeira.

Em alguns exemplos de realização, o CDR sendo diversificado

(aleatorizado) pode ter um códon de parada projetado na seqüência molde (aqui referido como um "molde de parada"). Esse recurso fornece com êxito para a detecção e seleção de seqüências diversificadas baseadas na reparação do(s) códon(s) de parada na seqüência molde devido à incorporação do(s) oligonucleotídeo(s) compreendendo a(s) seqüência(s) para os aminoácidos variantes de interesse. Esta característica é ainda ilustrada nos Exemplos a seguir.

O domínio variável ou constante da cadeia leve e pesada do anticorpo também pode ser fundido a uma seqüência peptídica adicional, fornecendo a interação de um ou mais polipeptídeos de fusão na superfície da partícula viral ou célula. Estas seqüências peptídicas são aqui referidas como "domínios de dimerização". Domínios de dimerização podem incluir pelo menos uma ou mais seqüências dimerização ou, pelo menos, uma seqüência que inclui um resíduo cisteína ou ambos. Seqüências de dimerização adequadas incluem a das proteínas que possuem alfa-hélice anfipática no qual os resíduos hidrofóbicos estão regularmente espaçados e permitem a formação de um dímero pela interação dos resíduos hidrofóbicos de cada proteína; tais proteínas e porções de proteínas incluem, por exemplo, regiões de zíper de leucina. Domínios de dimerização também podem incluir um ou mais resíduos de cisteína (por exemplo, como fornecido pela inclusão de uma seqüência da região de dobradiça do anticorpo dentro do domínio de dimerização). Os resíduos de cisteínas podem fornecer dimerização pela formação de uma ou mais ligações de dissulfetos. Em um exemplo de realização, no qual o códon de parada está presente após o domínio de dimerização, o domínio de dimerização compreende, pelo menos, de um resíduo cisteína. Em alguns exemplos de realização, os domínios de dimerização estão localizados entre o domínio variável ou constante do anticorpo e os componentes da proteína da cápside viral.

Em alguns casos, o vetor codifica um único anticorpo-polipeptídeo de fago em uma cadeia única contendo, por exemplo, ambas as regiões variáveis pesada e leve fundidas a uma proteína da cápside. Nestes casos, o vetor é considerado como "monocistrônico", expressando uma transcrição sob o controle de um promotor específico. Por exemplo, um vetor pode utilizar um promotor (tal como a fosfatase alcalina (AP) ou promotor Tac) para conduzir a expressão de uma seqüência monocistrônica que codifica os domínios V_L e V_H, com um peptídeo ligante entre os domínios V_L e V_H. Esta seqüência cistrônica pode ser conectada a extremidade 5' de uma seqüência sinal (como, por exemplo, uma seqüência sinal de *malE* ou enterotoxina II termo-lábil (STII) da *E. coli*) e, na sua extremidade 3' a proteína da cápside viral completa ou em pare desta (como, por exemplo, a proteína do bacteriófago pIII). O polipeptídeo de fusão codificado por um vetor deste exemplo de realização é referido como "ScFv-pIII". Em alguns exemplos de realização, um vetor pode ainda compreende uma seqüência que codifica um domínio de dimerização (como um zíper de leucina) na sua extremidade 3', entre a segunda seqüência do domínio variável (por exemplo, V_H) e a seqüencia da proteína da cápside viral. Polipeptídeos de fusão compreendendo o domínio de dimerização são capazes de dimerizar para formar um complexo de dois polipeptídeos scFv (referidos no presente como "$(ScFv)^2$-pIII").

Em outros casos, as regiões variáveis de cadeias leves e pesadas podem ser expressas em polipeptídeos separados, utilizando assim um vetor "bicistrônico", permitindo a expressão de transcrições separadas. Nestes vetores, um promotor adequado, tal como o promotor a Ptac ou PhoA, é utilizado para direcionar a expressão de a mensagem bicistrônica. Um primeiro cístron codificando, por exemplo, um omínio variável de cadeia leve, pode ser conectado a extremidade 5' de uma seqüência sinal, tal como uma seqüência sinal de *malE* ou enterotoxina II termo-lábil (STII) da *E. coli* e, na extremidade 3'

uma seqüência de ácidos nucléicos que codifica uma seqüência de marcação, tal como marcador gD. Um segundo cístron, codificando, por exemplo, um domínio variável e um domínio constante da cadeia pesada CH1, está ligado na sua extremidade 5' a uma seqüência sinal, tal como uma seqüência sinal de *malE* ou enterotoxina II termo-lábil (STII) da *E. coli* e, na extremidade 3' uma proteína da cápside viral completa ou em pare desta.

Em um exemplo de realização de um vetor que fornece uma mensagem bicistrônica para a exibição de $F(ab')^2$-pIII, um promotor adequado, tal como o promotor Ptac ou PhoA (AP) promotor, conduz a expressão de um primeiro cístron que codifica o domínio variável de cadeia leve e um domínio constante operacionalmente ligado a extremidade 5' de uma seqüência sinal, tal como uma seqüência sinal de *malE* ou enterotoxina II termo-lábil (STII) da *E. coli* e, na extremidade 3' uma seqüência de ácidos nucléicos que codifica uma seqüência de marcação, tal como marcador gD. O segundo cístron codifica, por exemplo, um domínio variável e constante da cadeia pesada operacionalmente ligado na extremidade 5' a uma seqüência sinal, tal como uma seqüência sinal de *malE* ou enterotoxina II termo-lábil (STII) da *E. coli* e, na extremidade 3' tem um domínio de dimerização compreendendo a região de dobradiça da IgG e uma seqüência de zíper de leucina seguida por pelo menos uma porção de proteína da cápside viral.

EXIBIÇÃO DE POLIPEPTÍDEOS DE FUSÃO

Polipeptídeos de fusão de um polipeptídeo contendo CDR (por exemplo, um domínio variável de anticorpo) pode ser exibido na superfície de uma célula, vírus, ou partícula de fagomídeo em uma variedade de formas. Essas formas incluem fragmentos Fv de cadeia única (scFv), fragmento F(ab) e formas polivalente destes fragmentos. Por exemplo, formas multivalentes incluem um de ScFv, Fab, ou F(ab'), denominados no presente como (ScFv)2, $F(ab)^2$ e $F(ab')^2$, respectivamente. As formas multivalentes de exibição são

vantajosas em alguns contextos, em parte porque eles têm mais de um sítio de ligação ao antígeno que geralmente resulta na identificação de clones com menor afinidade e também permite a triagem mais eficiente de clones raros durante o processo de seleção.

Métodos para a exibição dos polipeptídeos de fusão que compreendem fragmentos de anticorpos sobre a superfície do bacteriófago são bem conhecidos no estado da técnica, por exemplo, como descrito na publicação patente número WO 92/01047 e no presente. Outras publicações de patentes WO 92/20791, WO 93/06213, WO 93/11236 e WO 93/19172, descrevem métodos e são todos incorporados ao presente pela referência. Outras publicações têm demonstrado a identificação de anticorpos com repertórios do gene V artificialmente reorganizado contra uma variedade de antígenos exibidos na superfície de um fago (como, por exemplo, em H. R. Hoogenboom & G. Winter, *J. Mol. Biol.* 227 381-388 (1992); e tal como divulgado nos documentos WO 93/06213 e WO 93/11236).

Quando um vetor é construído para exibição em um forma scFv, que inclui seqüências de ácidos nucléicos que codifica um domínio variável da cadeia leve do anticorpo e um domínio variável da cadeia pesada do anticorpo. Tipicamente, a seqüência de ácidos nucléicos que codifica um domínio variável da cadeia pesada do anticorpo é fundida a um componente da proteína da cápside viral. Um ou ambos os domínios variáveis de anticorpo pode ter aminoácidos variantes em, pelo menos, uma região de CDR. A seqüência de ácido nucléico que codifica o domínio variável da cadeia leve está conectada a seqüência de ácido nucléico que codifica o domínio variável da cadeia pesada por uma seqüência de ácido nucléico que codifica um polipeptídeo ligante. O polipeptídeo ligante normalmente contém cerca de 5 a 15 aminoácidos. Opcionalmente, outras seqüências de codificação, por exemplo, marcadores úteis para purificação ou detecção podem ser fundidos na extremidade 3' da

seqüência de ácido nucléico que codifica o domínio variável da cadeia leve ou domínio variável da cadeia pesada ou de ambos.

Quando um vetor é montado para exibição F(ab), ele inclui sequências de ácido nucléico que codificam domínios variáveis de anticorpo e domínios constantes de anticorpo. Um ácido nucléico que codifica um domínio variável de cadeia leve é unido a uma sequência de ácido nucléico que codifica um domínio contante de cadeia leve. Uma sequência de ácido nucléico que codifica um domínio variável de cadeia pesada de anticorpo é unida a uma sequência de ácido nucléico que codifica um domínio CH1 contante de cadeia pesada. Tipicamente, a sequência de ácido nucléico que codifica domínios variáveis e constantes de cadeia pesada são unidas a uma sequência de ácido nucléico que codifica toda ou parte de uma proteína de envelope viral. Um ou ambos domínios variáveis de cadeia leve ou pesada de anticorpo podem ter aminoácidos variantes em pelo menos um CDR. Em algumas realizações, os domínios variáveis e contantes de cadeia pesada são expressos como uma fusão com pelo menos uma porção de uma proteína de envelope viral, e os domínios variáveis e contantes de cadeia leve são expressos separadamente da proteína de envelope viral de fusão de cadeia pesada. As cadeias leves e pesadas associam-se umas com as outras, podendo ser por ligação covalente ou não-covalente. Opcionalmente, outras sequências que codificam, por exemplo, expressão de polipepitídeo útil para purificação e detecção, podem ser unidas no final 3' da sequência de ácido nucléico que codifica o domínio constante de cadeia leve de anticorpo ou o domínio constante de cadeia pesada de anticorpo ou ambos.

Em alguns exemplos de realização, um a molécula bivalente, por exemplo, um dímero $F(ab)_2$ ou $F(ab')_2$, é usado para exibir fragmentos de anticorpos com as substituições de aminoácidos variantes na superfície de uma partícula. Verificou-se que os dímeros $F(ab')_2$ geralmente têm a mesma

afinidade como os dímeros F(ab) em um ensaio de ligação ao antígeno em fase líquida, mas a velocidade de dissociação do $F(ab')_2$ é menor devido a uma maior avidez. Por isso, a forma bivalente (por exemplo, $F(ab')_2$) é uma forma particularmente útil, uma vez que pode permitir a identificação de clones com menor afinidade e permite também a triagem mais eficiente de clones raros durante o processo de seleção.

INTRODUÇÃO DE VETORES EM CÉLULAS HOSPEDEIRAS

Vetores construídos como descrito em conformidade com a invenção são introduzidos em uma célula hospedeira para a amplificação e/ou expressão. Vetores podem ser introduzidos em células hospedeiras utilizando métodos normais de modificação, incluindo eletroporação, precipitação em fosfato de cálcio e similares. Caso o vetor seja uma partícula infecciosa, tal como um vírus, o próprio vetor fornece a entrada na célula hospedeira. A transfecção das células hospedeiras contendo um vetor de expressão replicável que codifica um gene de fusão e a produção das partículas do fago de acordo com procedimentos padrões fornece partículas de fago no qual a proteína de fusão é exibida na superfície da partícula do fago.

Vetores de expressão replicáveis são introduzidos nas células hospedeiras utilizando uma variedade de métodos. Em um exemplo de realização, vetores podem ser introduzidos em células utilizando a eletroporação, tal como descrito no documento WO/00106717. As células são cultivadas em caldo de cultura padrão, opcionalmente por cerca de 6 a 48 horas (ou até atingir uma OD_{600} = 0,6 - 0,8) a cerca de 37°C, e, em seguida, o caldo é centrifugado e o sobrenadante removido (por exemplo, por decantação). Em alguns exemplos de realização, a purificação inicial inclui a resuspensão o *pellet* de célula em uma solução tampão (por exemplo, 1,0 mM de HEPES pH 7,4), seguida por uma nova centrifugação e remoção do sobrenadante. O *pellet* de célula resultante é resuspenso em diluente glicerol

(por exemplo: 5-20% v/v) e novamente centrifugado para formar um *pellet* de células e ter o sobrenadante removido. A concentração final é obtida por célula pela resuspensão do *pellet* de células em água ou glicerina diluída na concentração desejada.

Em certos exemplos de realização, a célula receptora é uma cepa de *E. coli* competente a eletroporação da presente invenção, que é a *E. coli* cepa SS320 (Sidhu *et al.*, *Methods. Enzymol.* (2000), 328:333-363). A cepa SS320 foi preparada por meio de cruzamentos com células MCI061 XL1-BLUE em condições suficientes para transferir episomo de fertilidade (plasmídeo F') ou XL1-BLUE em células MC1061. A cepa SS320 foi depositada com o número da *American Type Culture Collection* (ATCC), 10801 *University Boulevard*, Manassas EUA, em 18 de junho de 1998 e com o Número de Acesso Nº 98795. Qualquer episomo F' que permita a replicação no fago na cepa pode ser utilizado na invenção. Episomos adequados estão disponíveis a partir das cepas depositadas junto com a ATCC ou são disponíveis comercialmente (CJ236, CSH18, FHD, JM101, JM103, JM105, JM107, JM109, JM110), KS1000, XL1-blue, 71-18 e outros).

A utilização de concentrações mais elevadas de DNA durante eletroporação (cerca de 10X) aumenta a eficiência de modificação e a aumenta a quantidade de DNA modificado nas células hospedeiras. A utilização de elevadas concentrações de células (cerca de 10X) também aumenta a eficiência. A maior quantidade de DNA transferido produz bibliotecas maiores com uma maior diversidade e representam um grande número de membros únicos de uma biblioteca combinatória. Células transformadas geralmente são selecionadas pelo crescimento em meio contendo antibióticos.

SELEÇÃO (TRIAGEM) E RASTREIO DE LIGANTES PARA OS ALVOS DE ESCOLHA

O uso de exibição por fago para a identificação de ligantes para o antígeno alvo, com suas várias permutações e variações na metodologia, estão

bem estabelecidas no estado da técnica. Uma abordagem envolve construir uma família de vetores variantes replicáveis contendo um elemento regulador de transcrição operacionalmente ligado a um gene que codifica um polipeptídeo de fusão, modificando as células hospedeiras adequadas, e cultivando as células transformadas para formar partículas de fagos que exibam o polipeptídeo de fusão na superfície do fago, seguido por um processo que implica na seleção ou triagem pela exposição das partículas de fagos recombinantes com um antígeno alvo de modo a que pelo menos uma parte da população de partículas liga-se ao alvo com o objetivo de aumentar e enriquecer os subconjuntos de partículas que se ligam das partículas que não se ligam no âmbito do processo de seleção. O *pool* selecionado pode ser amplificado pela infecção em células hospedeiras, tais como células *XLI-Blue*, para uma outra etapa de triagem no mesmo alvo com a mesma ou com estringência diferente. O *pool* de variantes é então rastreado contra o antígeno alvo para identificar novas proteínas ligantes de alta afinidade. Estas novas proteínas com alta afinidade de ligação podem ser úteis como agentes terapêuticos como agonistas ou antagonistas, e/ou como reagentes para diagnóstico e pesquisa.

Os polipeptídeos de fusão tais como domínios variáveis de anticorpos compreendendo aminoácidos variantes podem ser expressos na superfície de um fago, partícula de fagomídeo ou célula e, em seguida, selecionado e/ou rastreado pela capacidade dos membros do grupo do polipeptídeo de fusão se ligar a um antígeno alvo que é tipicamente o antígeno de interesse. Os processos de seleção para os ligantes ao alvo podem também ser incluídos selecionando em uma proteína genérica tendo afinidade para o domínio variável de anticorpo tal como a proteína L ou um marcador de anticorpo específico que se liga ao anticorpo ou fragmentos de anticorpo exibidos no fago, que podem ser utilizados para enriquecer os membros da

biblioteca que exibem fragmentos de anticorpo corretamente enovelados (polipeptídeos de fusão).

Proteínas alvo, tais como os receptores DR5 e HER-2 podem ser isolados a partir de fontes naturais ou preparados pelos métodos recombinantes por procedimentos conhecidos no estado da técnica. Seqüências de DR5 humano e murino são fornecidas na Tabela 1. A seqüência e a preparação do HER-2 ECD foi descrita em Franklin MC. Carey KD. Vajdos FF. Leahy DJ. de Vos AM. Sliwkowski MX, *Insights into ErbB signaling from the structure of the ErbB2-pertuzumab complex*, *Cancer Cell.* 5(4):317-28, 2004. A seqüência de aminoácidos de um domínio extracelular 23-646 da HER-2 é fornecida no *Protein DataBank Record* 1S78 (2004). Antígenos alvos podem incluir um número de moléculas da terapia de interesse.

Uma variedade de estratégias de seleção (triagem) por afinidade pode ser usado. Um exemplo é um método de triagem em suporte sólido ou triagem em placa ou triagem com o alvo imobilizada. Outro exemplo é o método de ligação em solução. Para o método de triagem em suporte sólido, a proteína alvo pode ser fixada em uma matriz sólida ou semi-sólida apropriada. Tais matrizes são conhecidas no estado da técnica como, por exemplo, esferas de agarose, esferas de acrilamida, esferas de vidro, celulose, vários copolímeros acrílicos, géis de metacrilato hidroxila, copolímeros poliacrílico e polimetacrílico, nylon, transportadores neutros e iônicos, e semelhantes. A fixação da proteína alvo à matriz pode ser realizada através dos métodos descritos em *Methods in Enzymology*, vol. 44 (1976) ou por outra técnica conhecida no estado da arte.

Após a fixação do antígeno alvo na matriz, a alvo imobilizada é exposto a biblioteca expressando os polipeptídeos de fusão em condições adequadas para a ligação de pelo menos um subconjunto da partícula do fago com o antígeno alvo imobilizado. Normalmente, as condições, incluindo o pH,

força iônica, temperatura e similares irá mimetizar as condições fisiológicas. Partículas ligadas ("ligantes") ao alvo imobilizado são separadas por lavagem das partículas que não se ligam ao alvo. As condições de lavagem podem ser ajustadas para resultar na remoção de todos, menos os ligantes de alta afinidade. Os ligantes podem ser dissociados do alvo imobilizado por uma variedade de métodos. Estes métodos incluem a dissociação competitiva utilizando um ligante do tipo selvagem (por exemplo, excesso de antígeno alvo), alterando o pH e/ou força iônica, e outros métodos conhecidos no estado da técnica. A seleção de ligantes envolve tipicamente a eluição de uma matriz de afinidade com um material adequado para eluição ta como ácido como HCl 0,1M ou ligantes. A eluição com o aumento da concentração de ligante poderia eluir as moléculas ligantes exibidas de afinidade aumentada.

Os ligantes podem ser isolados e em seguida re-amplificados em células hospedeiras adequadas pela infecção das células com as partículas virais que são ligantes (e auxiliadores de fago se necessário, por exemplo, quando a partícula viral é uma partícula de fagomídeo) e as células hospedeiras são então cultivadas sob condições adequadas para a amplificação das partículas que exibem o polipeptídeo de fusão pretendido. As partículas de fago são coletadas e o processo de seleção é repetido uma ou mais vezes, até que os ligantes do antígeno alvo estejam enriquecidos. Qualquer número de etapa de seleção ou triagem pode ser utilizado. Um dos processos de seleção ou triagem pode envolver o isolamento de ligantes que se ligam a uma proteína de afinidade genérica como, por exemplo, a proteína L ou um anticorpo para um polipeptídeo marcador presente no polipeptídeo exibido como, por exemplo, anticorpos para a proteína gD ou marcador poli-histidina. A contraseleção pode ser incluída em uma ou várias etapas de seleção ou triagem para isolar ligantes que também apresentam ligação indesejada a um ou mais antígenos não alvo.

Um aspecto da invenção envolve seleção contra bibliotecas da invenção utilizando um novo método de seleção que é denominado "método de ligação em solução". A invenção a triagem na fase de solução com muito mais eficiência do que os métodos de triagem em solução convencionais. O método de ligação em solução pode ser utilizado para encontrar ligantes originais a partir de uma biblioteca aleatorizada ou identificando ligantes melhorados em uma biblioteca que foi designada para melhorar a afinidade de um determinado clone ligante ou grupo de clones. O método compreende na exposição de uma variedade de polipeptídeos, tal como polipeptídeos expostos por fagos ou partículas de fagomídeos (biblioteca), com um antígeno alvo marcado ou fundido com uma molécula marcadora. O marcador pode ser a biotina ou outras moléculas ligantes específicas disponíveis para este fim. A estringência da fase de solução pode variar utilizando concentrações decrescentes de antígeno alvo marcado na primeira fase de solução. Para aumentar ainda mais a estringência, a primeira fase de ligação em solução pode ser seguida por uma segunda fase em solução com alta concentração de antígeno alvo não marcado após a ligação inicial com o antígeno marcado na primeira fase de solução. Normalmente, um excesso de 100 a 1000 vezes de antígeno alvo não marcado é usado na segunda fase (se for incluída). A duração do período de incubação da primeira fase de solução pode variar de alguns minutos a um ou duas horas ou mais para alcançar o equilíbrio. Usando um período curto de tempo nesta primeira fase de ligação pode influenciar ou selecionar ligantes que têm velocidade de dissociação rápida. O período de tempo e temperatura de incubação na segunda fase pode ser modificado para aumentar o estringência. Esta fornece uma influencia de seleção para ligantes que possuem velocidade lenta de velocidade de dissociação (*off-rate*) lenta ao alvo. Após a exposição de uma variedade de polipeptídeos (exibido no fago / partículas de fagomídeo) com um antígeno alvo, o fago ou partículas de

fagomídeo que estão ligadas aos antígenos alvos marcados são separados dos fagos que não se ligaram. A mistura da partícula-alvo na fase de solução de ligantes é isolada expondo esta com a molécula alvo marcada e permitindo que estes se liguem a molécula que está ligada a molécula alvo marcada por um curto período de tempo (por exemplo, de 2 a 5 minutos). A concentração inicial do antígeno alvo marcado pode variar em cerca de 0,1 nM a cerca de l000 nM. As partículas ligadas são eluídas e podem ser propagadas para a próxima etapa de triagem. Em certos exemplos de realização, várias etapas de triagem são realizadas utilizando concentrações cada vez menores de antígeno alvo marcado a cada etapa de triagem.

Por exemplo, uma classificação ou seleção inicial utilizando cerca de 100 a 250 nM de antígeno alvo marcado deve ser o suficiente para capturar uma vasta gama de afinidades, embora este fator possa ser determinado empiricamente e/ou adaptado ao desejo do técnico. Na segunda etapa de seleção, cerca de 25 a 100 nM de antígeno alvo marcado pode ser utilizado. Na terceira etapa de seleção, cerca de 0,1 nM a 25 nM de antígeno alvo marcado pode ser utilizado. Por exemplo, para melhorar a afinidade 100 nM de um ligante, pode ser desejável para iniciar com 20 nM e, em seguida, aumentar progressivamente de 1 a 5 nM de antígeno alvo marcado e, então, seguido por uma concentração ainda mais baixa como cerca de 0,1 nM de antígeno alvo marcado.

A solução de triagem convencional envolve o uso de esferas como esferas revestidas de estreptoavidina, que são muito pesadas para uso e, muitas vezes, resultam em uma eficiência muito baixa a recuperação do fago ligante. A solução de triagem convencional com esferas leva um tempo muito maior do que 2-5 minutos e é menos viável para adaptar a alta produção automatizada que a invenção descreve acima.

Tal como descrito no presente, combinações de um suporte sólido e os métodos de triagem em solução pode ser vantajosamente utilizados para

isolar ligantes com características desejadas. Após a seleção/triagem no antígeno alvo por algumas etapas, o rastreio de clones individuais a partir de um *pool* geralmente é realizado para identificar ligantes específicos de propriedades/ características desejadas. Em alguns exemplos de realização, o processo de triagem é realizado por sistemas automatizados para permitir uma triagem de alto rendimento de biblioteca candidatas.

Dois métodos principais de rastreio são descritas a seguir. No entanto, outros métodos conhecidos no estado da técnica também podem ser utilizados nos métodos da invenção. O primeiro método de rastreio inclui um ensaio de ELISA em fago com o antígeno alvo imobilizado, que permite a identificação de um clone ligante específico a partir de um clone não ligante. A especificidade pode ser determinada pela análise simultânea do clone em poços revestidos com o alvo e BSA ou poços revestidos com outras proteínas que não são as proteínas alvo. Este ensaio é automatizado para uma seleção de alto rendimento.

Um exemplo de realização fornece um método de seleção para um domínio variável de anticorpo que se liga a um antígeno alvo específico de uma biblioteca de domínio variável de anticorpos, gerando uma biblioteca de vetores de expressão replicável compreendendo uma variedade de polipeptídeos; e expondo a biblioteca com um antígeno alvo e, pelo menos, um antígeno que não é o antígeno alvo em condições adequadas para a ligação; e separando os polipeptídeo ligantes na biblioteca dos não ligantes; e identificando os ligantes que se ligam ao antígeno alvo e os que não se ligam ao antígeno que não é o antígeno alvo; e eluindo os ligantes do antígeno alvo; e amplificando os vetores de expressão replicável contendo os polipeptídeos ligantes que se ligam a um antígeno específico.

O segundo ensaio de triagem é um ensaio de triagem por afinidade fornecido para separar clones que possuem alta afinidade dos clones

que possuem baixa afinidade, em uma maneira de alta produção. No ensaio, cada clone é testado com e sem a primeira incubação cm o antígeno alvo em concentração específica, por um período de tempo (por exemplo, 30 a 60 minutos) antes da aplicação nos poços previamente revestidos com antígeno (por exemplo, por 5 a 15 minutos). Depois o fago ligado é mensurado pelo método habitual de ELISA com fago, por exemplo, utilizando anti-M13 conjugados com HRP. A relação do sinal de ligação dos dois poços, um que foi pré-incubado com antígeno e o outro e assim não pré-incubado com antígeno alvo é uma indicação de afinidade. A seleção da concentração do antígeno alvo para a primeira incubação depende da abrangência de afinidade de interesses. Por exemplo, se os ligantes com afinidade superior a 10 nM são desejados, então freqüentemente é utilizado 100 nM de antígeno alvo na primeira incubação. Uma vez que os ligantes são encontrados a partir de uma etapa de triagem (seleção), estes clones podem ser rastreados com um ensaio por afinidade de rastreio para identificar os ligantes com maior afinidade.

Combinações de alguns métodos de triagem/seleção descritos acima podem ser realizadas com os métodos de rastreio. Por exemplo, em um exemplo de realização, os polipeptídeo ligantes são primeiro selecionados pela ligação ao antígeno alvo imobilizado. Os polipeptídeo ligantes que se ligam ao antígeno alvo imobilizado podem então ser amplificados e rastreados pela ligação ao antígeno alvo e pela ausência de ligação aos antígenos que não são os antígenos alvo. Os polipeptídeo ligantes que se ligam especificamente ao antígeno alvo são então amplificados. Estes polipeptídeos ligantes podem, então, ser selecionados por alta afinidade pela exposição com uma concentração de antígeno alvo marcado para formar um complexo, em uma faixa de antígenos marcados de cerca de 0,1 nM a 1000 nM, os complexos são isolados pela exposição com um agente que se liga ao marcador sobre o antígeno alvo. Os polipeptídeos ligantes são eluídos dos antígenos alvo

marcados e opcionalmente, as etapas de seleção são repetidas, utilizando sempre uma concentração menor de antígeno alvo marcado a cada etapa. Os polipeptídeos ligantes de alta afinidade isolados utilizando este método de seleção podem então ser rastreados pela alta afinidade usando uma variedade de métodos conhecidos no estado da técnica, alguns dos quais estão descritos no presente.

Esses métodos podem localizar clones com alta afinidade, sem ter que realizar longos e complexos ensaios de afinidade por competição sobre um grande número de clones. O aspecto intensivo em realizar ensaios complexos de muitos clones é freqüentemente um obstáculo importante para se encontrar melhores clones por seleção. Este método é especialmente útil na tentativa de melhoria na afinidade no qual vários ligantes com afinidade semelhantes podem ser recuperados a partir do processo de seleção. Diferentes clones podem ter a eficiência de expressão / de exibição em fago ou partículas de fagomídeo muito diferentes. Esses clones mais altamente expressos apresentam melhores chances de recuperação. Isto é, a seleção pode ser induzida pelos níveis de exibição ou expressão dos variantes. O método de classificação dos ligantes em solução da invenção pode melhorar o processo de seleção para localizar ligantes com alta afinidade. Este método é um ensaio para se rastrear a afinidade que fornece uma vantagem significativa em termos de triagem de ligantes melhores de forma rápida e fácil.

Os anticorpos ou fragmentos ligantes de antígenos ainda podem ser selecionados pela atividade funcional, por exemplo, por exemplo, atividade agonista ou antagonista. Por exemplo, anticorpos anti-HER-2 podem ser selecionados pela capacidade de inibir a fosforilação da tirosina em HER-2 e a proliferação de células cancerosas ou de induzir apoptose em células cancerosas. Ensaios para identificar e mensurara essas atividades estão descritas, por exemplo, no documento W098/17797.

Além disso, anticorpos anti-DR5 podem ser selecionados pela capacidade de induzir a apoptose em células cancerosas e/ou inibir a função das células inflamatórias. Em outros exemplos de realização, anticorpos anti-DR5 são selecionados pela capacidade de competir com o DR5 pela ligação ao Apo-2L. Em outros exemplos de realização, anticorpos anti-DR5 humano são selecionados pela ligação ao DR5 murino e/ou DR5 de macacos cinomolgos. Ensaios para se determinar a atividade biológica podem ser realizados por meio de métodos conhecidos no estado da técnica, como a fragmentação de DNA (vide, por exemplo, Marsters *et al.*, *Curr. Biology*, 6:1669 (1996)), inativação da caspase, ligação ao DR5 (vide, por exemplo, documento WO 98/51793, publicado em 19 de Novembro de 1998. O nível de apoptose pode ser mensurada através da identificação da condensação do citoplasma, perda das micro vilosidades da membrana plasmática, segmentação do núcleo, degradação do DNA cromossômico ou perda da função mitocondrial. Esta atividade pode ser determinada e mensurada, por exemplo, por ensaios de viabilidade celular (tal como o ensaio com *Alamar blue* ou ensaios MTT), análise por FACS, ativação da caspase, fragmentação do DNA (vide, por exemplo, Nicoletti *et al., J. Immunol. Methods*, 139: 271-279 (1991), e polimerase ribose poli-ADP, clivagem de "PARP" e ensaios conhecidos no estado da técnica.

Em um exemplo de realização, como o ensaio para a apoptose envolve a realização de duas vezes as diluições seriais do controle padrão e do anticorpo anti-DR5 em placas de cultura de 96 poços. O Apo-2 ligante (aminoácidos 114-281, descrito na PCT US 00/17579) é testada para efeitos de comparação. Colo-205 (20000 células ~ poço) com células de carcinoma de cólon humano (ATCC) são semeadas em placas de 96 poços. As placas são incubadas a 37°C por 24 horas. *AlamazBlue* (*Trek Diagnostic Systems, Inc.*) é adicionado aos poços nas últimas 3 a 24 horas do tempo de incubação. A

fluorescência é lida utilizando um fluorômetro para placas de 96 poços utilizando o comprimento de onda para a excitação de 530 nm e de emissão a 590 nm. Os resultados são expressos como unidades de fluorescência relativa (RFU).

Após a identificação dos ligantes pela ligação ao antígeno alvo, e/ou ensaios funcionais dos ácidos nucléicos podem ser extraídas. O DNA extraído pode então ser utilizado diretamente para transformar células hospedeiras de *E. coli* ou alternativamente, as seqüências de codificação pode ser amplificadas, por exemplo, utilizando PCR com *primers* adequados, e seqüenciados por qualquer método típico seqüenciamento. O DNA de domínios variáveis dos ligantes pode ser digerido por enzima de restrição e, em seguida, inserido em um vetor para a expressão da proteína.

Populações compreendendo polipeptídeos tendo CDR(s) com seqüências de diversidade restrita de acordo com os métodos da invenção podem ser utilizados para isolar ligantes contra uma variedade de alvos, incluindo aqueles listados nas Figuras 11, 15, 21A e 24A. Estes ligantes podem compreender um ou mais CDRs variantes abrangendo diversas seqüências geradas usando códons restritos. Em alguns exemplos de realização, uma CDR variante é CDRH3 compreendendo a diversidade de seqüência gerada pela substituição de aminoácidos com um conjunto de códons restrito e/ou inserções de aminoácidos resultantes de CDRH3 de comprimentos variados. Oligonucleotídeos ilustrativos úteis para a geração de polipeptídeos de fusão da invenção incluem os referidos nas Figuras 9A-D, Figuras 20A-L e Figura 23. Um ou mais CDRs variantes podem ser combinados. Em alguns exemplos de realização, apenas o CDRH3 é diversificado. Em outros exemplos de realização, dois ou mais CDRs de cadeia pesada, incluindo o CDRH3, são variantes. Em outros exemplos de realização, um ou mais CDRs de cadeia pesada, excluindo o CDRH3, são variantes. Em alguns exemplos de realização, pelo menos um CDR de cadeia pesada e, pelo menos, um de cadeia leve são variantes, Em alguns exemplos de

realização, pelo menos um, dois, três, quatro, cinco ou todos os CDRs H1, H2, H3, L1, L2 e L3 são variantes.

Em alguns casos, pode ser benéfico combinar um ou mais CDRs de diversificados de cadeia leve com os novos ligantes isolados a partir de uma população de polipeptídeos que inclui um ou mais CDRs de cadeia pesada diversificados. Este processo pode ser referido como um processo etapa-2. Um exemplo de um processo etapa-2 compreende primeira a determinação de ligantes (geralmente ligantes de menor afinidade) dentro de uma ou mais bibliotecas geradas pela aleatorização de um ou mais CDRs, no qual os CDRs aleatorizados, em cada biblioteca são diferentes, ou, no caso de o mesmo CDR ser aleatorizado, este é aleatorizado para gerar seqüências diferentes. Ligantes de uma biblioteca de cadeia pesada podem então ser aleatorizados com uma variedade de CDR de cadeia leve, por exemplo, pela técnica de mutagênese, tal como a técnica de Kunkel, ou por clonagem (recortar e colar (por exemplo, pela ligação de diferentes seqüências de CDR juntas)) A nova biblioteca de cadeia leve na cadeia pesada do ligante atual que possui apenas uma fixação na cadeia leve. O *pool* pode então ser adicionalmente classificado contra um ou mais alvos para identificar ligantes que possuem uma afinidade aumentada. Ligantes (por exemplo, ligantes de baixa afinidade) obtidos a partir de uma triagem de H1/H2/H3 podem, por exemplo, serem fundidos com uma diversidade de bibliotecas de L1/L2/L3 para substituir os L1/L2/L3 originais fixos, no qual as novas bibliotecas são então selecionadas adicionalmente contra um alvo de interesse para se obter outro conjunto de ligantes (por exemplo, ligantes de alta afinidade). Novas seqüências de anticorpo que exibem maior afinidade de ligação podem ser identificadas por uma variedade de antígenos alvo.

Em alguns exemplos de realização, bibliotecas compreendendo polipeptídeos da invenção são submetidas a uma variedade de etapas de

triagem, no qual cada etapa inclui a triagem compreende a exposição do ligante obtido da etapa anterior com um(alguns) antígeno(s) alvo(s) distinto(s) do(s) antígeno(s) alvo(s) da(s) etapa(s) anterior(es). Preferencialmente, mas não necessariamente, os antígenos alvos são homólogos na seqüência, por exemplo, membros de uma família de polipeptídeos relacionadas, mas distintos, como por exemplo, mas não limitado a, citocinas (por exemplo, subtipos de interferon alfa).

PRODUÇÃO DE BIBLIOTECAS COMPREENDENDO POLIPEPTÍDEOS CONTENDO CDR VARIANTE

Bibliotecas de polipeptídeos CDR variantes podem ser produzidas pela mutação de uma posição acessível ao solvente e/ou altamente diversificada em, pelo menos, um CDR de um domínio variável do anticorpo. Alguns ou todos os CDRs podem ser mutados usando os métodos da invenção. Em alguns exemplos de realização, pode ser preferível a gerar diversas bibliotecas de anticorpos pela mutação em posições de CDRH1, CDRH2 e CDRH3 para formar uma única biblioteca ou a pela mutação de posições em CDRL3 e CDRH3 para formar uma única biblioteca ou pela mutação de posições em CDRL3 e CDRH1, CDRH2 e CDRH3 para formar uma única biblioteca.

Uma biblioteca de domínio variável de anticorpos pode ser produzida, por exemplo, por mutações na posição acessível ao solvente e/ou altamente diversificada de CDRH1, CDRH2 e CDRH3. Outra biblioteca pode ser gerada com mutações no CDRL1, CDRL2 e CDRL3. Estas bibliotecas também podem ser usadas em conjunção com outras para gerar ligantes de afinidades desejadas. Por exemplo, depois de uma ou várias etapas de seleção das bibliotecas de cadeia pesada para a ligação a um antígeno alvo, uma biblioteca de cadeia leve pode ser substituída na população dos ligantes de cadeia pesada por etapas de seleção adicionais para aumentar a afinidade dos ligantes.

Em um exemplo de realização, uma biblioteca é criada pela substituição de aminoácidos originais com um conjunto limitado de aminoácidos variantes na região CDRH1, CDRH2 e/ou CDRH3 da região variável da seqüência de cadeia pesada e/ou da região CDRL3 da região variável da seqüência de cadeia leve. De acordo com a invenção, esta biblioteca pode incluir uma variedade de seqüências de anticorpos, no qual a variedade de seqüência é principalmente na região CDRH3 da seqüência de cadeia pesada.

Em um aspecto, a biblioteca é criada no contexto da seqüência do anticorpo 4D5 humanizado, ou a seqüência de aminoácidos da região estrutural do anticorpo 4D5 humanizado. Em certos exemplos de realização, a biblioteca é criada pela substituição de, pelo menos, os resíduos 28 e 30-33 de CDRH1, os resíduos 50, 52-54, 56 e 58 de CDRH2, os resíduos 95, 96, 97, 98, 99, 100, 100a, 100b e 100c de CDRH3, os resíduos 91-94 e 96 de CDRL3 com o conjunto de aminoácidos estabelecidos como exibido na Figura 8 para a biblioteca "YSGR-A". Em certos exemplos de realização, a biblioteca é criada pela substituição de, no mínimo, os resíduos 28 e 30-33 de CDRH1, os resíduos 50, 52-54, 56 e 58 de CDRH2, os resíduos 95, 96, 97, 98, 99, 100, 100a , 100b e 100c de CDRH3, os resíduos 91-94 e 96 de CDRL3 com o conjunto de aminoácidos estabelecidos como exibido na Figura 8 para a biblioteca "YSGR-B". Em certos exemplos de realização, a biblioteca é criada pela substituição de, pelo menos, os resíduos 28 e 30-33 de CDRH1, os resíduos 50, 52-54, 56 e 58 de CDRH2, os resíduos 95, 96, 97, 98, 99, 100, 100a, 100b e 100c de CDRH3, e os resíduos 91-94 e 96 de CDRL3 com o conjunto de aminoácidos estabelecidos como exibido na Figura 8 para a biblioteca "YSGR-C". Em certos exemplos de realização, a biblioteca é criada pela substituição de, pelo menos, os resíduos 28 e 30-33 de CDRH1, os resíduos 50, 52-54, 56 e 58 de CDRH2, os resíduos 95, 96, 97, 98, 99, 100,

100a, 100b e 100c de CDRH3, os resíduos 91-94, 96 de CDRL3 com o conjunto de aminoácidos estabelecidos como exibido na Figura 8 para a biblioteca "YSGR-D". As posições de aminoácidos 100b e 100c podem ter um identificador alfabético diferente dependendo do comprimento do CDRH3, mas estas posições são as duas últimas posições de CDRH3 antes da posição 101. Exemplos de seqüências adequadas de oligonucleotídeos incluem, mas não se limitando a, as listadas nas Figuras 9A-D e pode ser determinado pelo técnico especialista no assunto, de acordo com os critérios descritos no presente.

Em certos exemplos de realização, a biblioteca é criada pela substituição de, pelo menos, os resíduos 28 e 30-33 de CDRH1, os resíduos 50, 52, 53, 54, 56 e 58 de CDRH2, os resíduos 95-100m de CDRH3, os resíduos 91-94 e 96 de CDRL3 com o conjunto de aminoácidos estabelecidos como exibido na Figura 19A para a biblioteca "SAH3". Em certos exemplos de realização, a biblioteca é criada pela substituição de, pelo menos, os resíduos 28 e 30-33 de CDRH1, os resíduos 50, 52, 53, 54, 56 e 58 de CDRH2, os resíduos 95-100m de CDRH3, os resíduos 91-94 e 96 de CDRL3 com o conjunto de aminoácidos estabelecidos como exibido na Figura 19A para a biblioteca "SCH3". Em certos exemplos de realização, a biblioteca é criada pela substituição de, pelo menos, os resíduos 28 e 30-33 de CDRH1, os resíduos 50, 52, 53, 54, 56 e 58 de CDRH2, os resíduos 95-100m de CDRH3, os resíduos 91-94 e 96 de CDRL3 com o conjunto de aminoácidos estabelecidos como exibido na Figura 19A para a biblioteca "SFH3". Em certos exemplos de realização, a biblioteca é criada pela substituição de, pelo menos, os resíduos 28 e 30-33 de CDRH1, os resíduos 50, 52, 53, 54, 56 e 58 de CDRH2, os resíduos 95-100m de CDRH3, os resíduos 91-94 e 96 de CDRL3 com o conjunto de aminoácidos estabelecidos como exibido na Figura 19A para a biblioteca "SGH3". Em certos exemplos de realização, a biblioteca é criada pela substituição de, pelo menos, os resíduos 28 e 30-33 de CDRH1, os resíduos

50, 52, 53, 54, 56 e 58 de CDRH2, os resíduos 95-100m de CDRH3, os resíduos 91-94 e 96 de CDRL3 com o conjunto de aminoácidos estabelecidos como exibido na Figura 19A para a biblioteca "SIH3". Em certos exemplos de realização, a biblioteca é criada pela substituição de, no pelo menos, os resíduos 28 e 30-33 de CDRH1, os resíduos 50, 52, 53, 54, 56 e 58 de CDRH2, os resíduos 95-100m de CDRH3, os resíduos 91-94 e 96 de CDRL3 com o conjunto de aminoácidos estabelecidos como exibido na Figura 19A para a biblioteca "SLH3". Assim como o comprimento de CDRH3 varia, as duas últimas posições antes da posição 101 podem ter diferentes identificadores alfabéticos dependendo do comprimento do CDRH3, mas estas posições são as duas últimas posições de CDRH3 antes da posição 101. Exemplos de seqüências adequadas de oligonucleotídeos incluem, mas não se limitando a, as listadas nas Figuras 20A-20L, e pode ser determinado pelo técnico especialista no assunto, de acordo com os critérios descritos no presente.

Em certos exemplos de realização, a biblioteca é criada pela substituição de, pelo menos, os resíduos 28 e 30-33 de CDRH1, resíduos 50, 52, 53, 54, 56 e 58 de CDRH2, os resíduos 95-100m de CDRH3, os resíduos 91-94 e 96 de CDRL3 com o conjunto de aminoácidos estabelecidos como exibido na Figura 19B para a biblioteca "SNH3". Em certos exemplos de realização, a biblioteca é criada pela substituição de, pelo menos, os resíduos 28 e 30-33 de CDRH1, os resíduos 50, 52, 53, 54, 56 e 58 de CDRH2, os resíduos 95-100m de CDRH3, os resíduos 91-94 e 96 de CDRL3 com o conjunto de aminoácidos estabelecidos como exibido na Figura 19B para a biblioteca "SPH3". Em certos exemplos de realização, a biblioteca é criada pela substituição de, pelo menos, os resíduos 28 e 30-33 de CDRH1, os resíduos 50, 52, 53, 54, 56 e 58 de CDRH2, os resíduos 95-100m de CDRH3, os resíduos 91-94 e 96 de CDRL3 com o conjunto de aminoácidos estabelecidos como exibido na Figura 19B para a biblioteca "SRH3". Em certos exemplos de

realização, a biblioteca é criada pela substituição de, pelo menos, os resíduos 28 e 30-33 de CDRH1, os resíduos 50, 52, 53, 54, 56 e 58 de CDRH2, os resíduos 95-100m de CDRH3, os resíduos 91-94 e 96 de CDRL3 com o conjunto de aminoácidos estabelecidos como exibido na Figura 19B para a biblioteca "STH3". Em certos exemplos de realização, a biblioteca é criada pela substituição de, pelo menos, os resíduos 28 e 30-33 de CDRH1, os resíduos 50, 52, 53, 54, 56 e 58 de CDRH2, os resíduos 95-100m de CDRH3, os resíduos 91-94 e 96 de CDRL3 com o conjunto de aminoácidos estabelecidos como exibido na Figura 19B para a biblioteca "SWH3". Em certos exemplos de realização, a biblioteca é criada pela substituição de, pelo menos, os resíduos 28 e 30-33 de CDRH1, os resíduos 50, 52, 53, 54, 56 e 58 de CDRH2, os resíduos 95-100m de CDRH3, os resíduos 91-94 e 96 de CDRL3 com o conjunto de aminoácidos estabelecidos como exibido na Figura 19B para a biblioteca "SYH3". Assim como o comprimento de CDRH3 varia, as duas últimas posições antes da posição 101 podem ter diferentes identificadores alfabéticos dependendo do comprimento do CDRH3, mas estas posições são as duas últimas posições de CDRH3 antes da posição 101. Exemplos de seqüências adequadas de oligonucleotídeos incluem, mas não se limitando a, as listadas nas Figuras 20A-20L, e pode ser determinado pelo técnico especialista no assunto, de acordo com os critérios descritos no presente.

Em certos exemplos de realização, a biblioteca é criada pela substituição de, pelo menos, os resíduos 28 e 30-33 de CDRH1, os resíduos 50, 52, 53, 54, 56 e 58 de CDRH2, os resíduos 95-100m de CDRH3, os resíduos 91-94 e 96 de CDRL3 com o conjunto de aminoácidos estabelecidos como exibido na Figura 22 para a biblioteca "SY". Em certos exemplos de realização, a biblioteca é criada pela substituição de, pelo menos, os resíduos 28 e 30-33 de CDRH1, os resíduos 50, 52, 53, 54, 56 e 58 de CDRH2, os resíduos 95-100m de CDRH3, os resíduos 91-94 e 96 de CDRL3 com o

conjunto de a minoácidos estabelecidos como exibido na Figura 22 para a biblioteca "SW". Em certos exemplos de realização, a biblioteca é criada pela substituição de, pelo menos, os resíduos 28 e 30-33 de CDRH1, os resíduos 50, 52, 53, 54, 56 e 58 de CDRH2, os resíduos 95-100m de CDRH3, os resíduos 91-94 e 96 de CDRL3 com o conjunto de aminoácidos estabelecidos como exibido na Figura 22 para a biblioteca "SR". Em certos exemplos de realização, a biblioteca é criada pela substituição de, pelo menos, os resíduos 28 e 30-33 de CDRH1, os resíduos 50, 52, 53, 54, 56 e 58 de CDRH2, os resíduos 95-100m de CDRH3, os resíduos 91-94 e 96 de CDRL3 com o conjunto de aminoácidos estabelecidos como exibido na Figura 22 para a biblioteca "SF". Assim como o comprimento de CDRH3 varia, as duas últimas posições antes da posição 101 podem ter diferentes identificadores alfabéticos dependendo do comprimento do CDRH3, mas estas posições são as duas últimas posições de CDRH3 antes da posição 101. Exemplos de seqüências adequadas de oligonucleotídeos incluem, mas não se limitando aquelas listadas na Figura 23, e pode ser determinado pelo técnico especialista no assunto, de acordo com os critérios descritos no presente

Em certos exemplos de realização, uma biblioteca é criada pela combinação com outras bibliotecas. Em um exemplo de realização, a biblioteca "SXH3" como utilizada no presente compreende as bibliotecas, SAH3, SCH3, SFH3, SGH3, SIH3, SLH3, SNH3, SPH3, SRH3, STH3, SWH3 e SYH3. Em outro exemplo de realização, a biblioteca "SX-superfície" compreende as bibliotecas "SY", "SW", "SR" e "SF".

Em outro exemplo de realização, diferentes projetos de CDRH3 são utilizados para isolar ligantes de alta afinidade e para isolar ligantes para uma variedade de epítopos. Para a diversidade na CDRH3, várias bibliotecas podem ser construídas separadamente, com diferentes comprimentos do H3 e, em então combinada para a seleção de ligantes para antígenos alvo. A

amplitude de comprimentos de CDRH3 gerada nesta biblioteca pode ser de 10-21,11-21, 12-21, 13-21, 14-21, 15-21, 16-21, 17-21, 18-21, 19-21, 20-21 aminoácidos, apesar de que diferentes comprimentos deste também podem ser gerados. A diversidade também pode ser gerada nos CDRH1 e CDRH2, como indicado acima. Em um exemplo de realização de uma biblioteca, a diversidade na H1 e H2 é gerada utilizando os oligonucleotídeos ilustrados nas Figuras 9A-D, L-20A e Figura 23. Outras oligonucleotídeos com variações nas seqüências também podem ser usados. Oligonucleotídeos podem ser usados isoladamente ou agrupados em uma variedade de combinações dependendo da função prática da necessidade e desejos do praticante. Em alguns exemplos de realização, posições aleatorizadas nos CDRs da cadeia pesada incluem as listadas nas Figuras 8, 9, 11,15, 19, 21, 22, 23, e 24.

Múltiplas bibliotecas podem ser reunidas e ordenadas usando métodos de suporte sólido e seleção em solução como descrito no presente. Estratégias de múltiplas classificações podem ser empregadas. Por exemplo, uma variação envolve a classificação no alvo ligado a fase sólida, seguido por uma triagem por um marcador que possa estar presente sobre o polipeptídeo de fusão (por exemplo, marcador anti-gD) e em seguida por outra classificação no alvo ligado a fase sólida. Alternativamente, as bibliotecas podem ser classificadas primeiro em um alvo ligado a uma superfície sólida, os ligantes eluídos são então ordenados usando uma ligação em fase líquida com a diminuição das concentrações de antígeno alvo. O uso de combinações de diferentes métodos de triagem fornece a minimização de seleção de apenas seqüências altamente expressas e fornece a seleção de um número elevado de clones de diferentes afinidades.

Dos ligantes isolados do *pool* de bibliotecas como descrito acima, foi descoberto que, em alguns casos, afinidade pode ser melhorada pelo fornecimento de diversidade limitado, à cadeia leve. A diversidade da cadeia

leve pode ser, mas não é, necessariamente, gerada através de variações nas posições 91-96 de aminoácido no CDRL3 ou em um subconjunto deste. Em um exemplo de realização, as posições aleatorizadas são aquelas listadas nas Figuras 8, 9, 11,15, 19, 21, 22, 23, e 24.

Ligantes de alta afinidade isolados a partir de bibliotecas destes exemplos de realização são facilmente produzidos em bactérias e em cultura de células eucarióticas em alto rendimento. Os vetores podem ser projetados para se remover com facilidade seqüências como, por exemplo, o marcador gD, a seqüência do componente da proteína da cápside viral, e/ou para acrescentar em seqüências da região constante para fornecer a produção de anticorpos de comprimento total ou fragmentos de ligação ao antígeno em alto rendimento. Qualquer combinação de conjuntos de códons e CDRs podem ser diversificadas, de acordo com os métodos da invenção.

VETORES, CÉLULAS HOSPEDEIRAS E MÉTODOS RECOMBINANTES

Para a produção recombinante de um anticorpo da invenção, os ácidos nucléicos que codificadores são isolados e inseridos em um vetor replicável para a clonagem (amplificação do DNA) ou para a expressão. Codificando o DNA o anticorpo é facilmente isolado e seqüenciado utilizando procedimentos convencionais (por exemplo, pela utilização de sondas de oligonucleotídeos que são capazes de se ligar especificamente aos genes codificadores das cadeias leves e pesadas do anticorpo). Muitos vetores estão disponíveis. A escolha do vetor depende em parte da célula hospedeira que será utilizada. Células hospedeiras geralmente preferidas incluem, mas sem limitar-se a, células de origem procariótica ou eucariótica (geralmente de mamíferos).

PRODUÇÃO DE ANTICORPOS UTILIZANDO CÉLULAS HOSPEDEIRAS PROCARIÓTICAS

CONSTRUÇÃO DE VETORES

Seqüências polinucleotídicas codificadoras de polipeptídeos

componentes do anticorpo da invenção podem ser obtidas utilizando técnicas padrões de recombinação. As seqüências polinucleotídicas desejadas podem ser isoladas e seqüenciadas de células produtoras de anticorpos, como células de hibridomas. Alternativamente, polinucleotídeos podem ser sintetizados utilizando sintetizadores de polinucleotídeos ou técnicas de PCR. Uma vez obtido, as seqüências codificadoras de polipeptídeos são inseridas em um vetor recombinante capaz de replicar e expressar os polinucleotídeos heterólogos em hospedeiros procarióticos. Muitos vetores que estão disponíveis e são conhecidos no estado da técnica podem ser utilizados para os fins da presente invenção. A seleção de um vetor apropriado vai depender principalmente do tamanho dos ácidos nucléicos a serem inseridos no vetor e a célula hospedeira específica a ser transformada com o vetor. Cada vetor contém diversos componentes, dependendo de sua função (amplificação ou expressão de polinucleotídeos heterólogos, ou ambos), e de sua compatibilidade coma a célula hospedeira particular na qual reside. Os componentes dos vetores geralmente incluem, mas não estão limitados a: uma origem de replicação, um gene marcador de seleção, um promotor, um local de ligação do ribossomo (RBS), um seqüência sinalizadora, a inserção do ácido nucléico heterólogo e uma seqüência de terminação de transcrição.

Geralmente, vetores plasmidiais recombinantes que contêm seqüências de controle e *replicon* que são derivadas de espécies compatíveis com a célula hospedeira são utilizados na conexão com estas hospedeiras. O vetor normalmente conduz como componentes da cadeia principal uma origem de local de reprodução, bem como seqüências de marcação que são capazes de fornecer seleção fenotípica em células transformadas. Por exemplo, a *E. coli*,é tipicamente, transformada utilizando um *pBR322*, um plasmídeo obtido a partir de uma espécie *E. coli. pBR322* que possui os genes que conferem a resistência a ampicilina (Amp) e a tetraciclina (Tet) e, portanto, fornece meios

para a identificação de células transformadas. As *pBR322*, seus derivados, ou outros plasmídeos microbianos ou bacteriófagos também podem conter, ou serem modificados por, promotores, que podem ser utilizados pelo organismo microbiano para a expressão de proteínas endógenas. Exemplos de derivados de *pBR322* utilizados para a expressão de anticorpos específicos são descritos em detalhes em Carter et al, Patente US 5.648.237.

Além disso, vetores de fagos que contêm seqüências de controle e de réplica que são compatíveis com o microorganismo hospedeiro podem ser utilizados como vetores de transformação em conexão com esses hospedeiros. Bacteriófago tal como λGEM.TM.-11, por exemplo, pode ser utilizado na fabricação de vetor recombinante que pode ser utilizado para transformar células hospedeiras suscetíveis tais como a *E. coli* LE392.

O vetor de expressão da invenção pode incluir dois ou mais pares promotores de *cístrons*, codificando cada componente do polipeptídeo. O promotor é uma seqüência de regulação não traduzida localizada à montante (5') de um cístron que modula a sua expressão. Promotores de procariotos geralmente se enquadram em duas classes, os induzíveis e os constitutivos. Os promotores induzíveis são promotores que iniciam níveis aumentados de transcrição do cístron sob seu controle em resposta a mudanças na condição de cultura, por exemplo, a presença ou ausência de um nutriente ou mudança na temperatura.

Uma grande quantidade de promotores é reconhecida por uma série de células hospedeiras potenciais. O promotor selecionado pode estar operacionalmente ligado a um DNA *cístron* que codifica a cadeia leve ou pesada, ao remover o promotor do DNA fonte por meio de enzimas de restrição e inserindo a seqüência do promotor isolado no vetor da invenção. Tanto a seqüência promotora nativa e muitos promotores heterólogos podem ser utilizados para direcionar a amplificação, pois eles geralmente permitem maior

transcrição e rendimentos mais altos do gene alvo expresso, quando comparado ao polipeptídeo promotor alvo nativo.

Os promotores apropriados para uso com hospedeiros procarióticos incluem o promotor phoA, sistemas promotores de lactose e β-lactamase, sistema promotor de triptofano (*trp*) e promotores híbridos, tais como o promotor *tac* ou *trc*. Entretanto, outros promotores que são funcionais em bactérias (tais como outros promotores de fagos ou bacterianos conhecidos) também são apropriados. Suas seqüências de nucleotídeos foram publicadas, de forma a permitir que os técnicos no assunto as liguem operacionalmente a unidades de transcrição que codificam cadeias leve e pesada alvo (Siebenlist *et al, Cell*, 20: 269 (1980)) utilizando ligantes ou adaptadores para fornecer quaisquer locais de restrição necessários.

Em um aspecto da invenção, cada cístron no vetor recombinante compreende um componente da seqüência sinalizadora de secreção que leva a translocação dos polipeptídeos expressos através de uma membrana. De forma geral, a seqüência sinalizadora pode ser um componente do vetor ou pode ser uma parte do DNA do polipeptídeo alvo que é inserido no vetor. A seqüência sinalizadora de secreção selecionada para os propósitos de acordo com a presente invenção deverá ser uma que seja reconhecida e processada (ou seja, clivada por uma peptidase sinalizadora I) pela célula hospedeira. Para células hospedeiras procarióticas que não reconhecem e processam as seqüências sinalizadoras nativas para os polipeptídeos heterólogos, a seqüência sinalizadora é substituída por uma seqüência sinalizadora procariótica selecionada, por exemplo, a partir do grupo que consiste de fosfatase alcalina, penicilinase, lpp ou líderes de enterotoxina II estáveis ao calor (STII), LamB, PhoE, PelB, OmpA e MBP. Em um exemplo de realização, a seqüência sinalizadora utilizada em ambos os cístrons do sistema de expressão é uma seqüência sinalizadora STII ou variante desta.

Em outro aspecto, a produção de imunoglobulinas pode ocorrer no citoplasma das células hospedeiras, e assim não necessitando da presença das seqüências sinais de secreção dentro de cada cístron. A este respeito, a cadeia leve e pesada da imunoglobulina são expressas, em dobro e reunidas para formar imunoglobulinas funcionais no citoplasma. Determinadas linhagens de células hospedeiras (por exemplo, cepas de *E.Coli trxB*) fornecem condições citoplásmicas que favorecem a formação de pontes de dissulfeto, permitindo desta forma a dobradiça e reunião apropriada das subunidades das proteínas expressas. Proba e Plukthun, *Gene*, 159:203(1995).

A presente invenção fornece um sistema de expressão no qual relação quantitativa do componente de polipeptídeo expresso pode ser modulado de forma a maximizar o rendimento do anticorpo secretado e devidamente montado da invenção. Tal modulação é realizada, pelo menos em parte, pela modulação translacional simultânea das fitas para os componentes do polipeptídeo.

Uma técnica para modular a força de tradução é descrita em Simmons *et al.*, Patente US 5.840.523. São utilizadas variantes da região de início da tradução (TIR) em um *cístron*. Para uma dada TIR, uma série de seqüência de aminoácido ou ácido nucléico variante podem ser criadas com uma variação nas forças de tradução, fornecendo desta forma, meios convenientes para ajustar este fator para o nível de expressão desejado da cadeia específica. Variantes TIR podem ser geradas a partir de técnicas de mutagênese convencionais que resultam em alterações nos códons que podem alterar a seqüência de aminoácido, embora alterações silenciosas na seqüência de nucleotídeo sejam preferidas. Alterações na TIR podem incluir, por exemplo, alterações no número ou espaçamento das seqüências Shine-Dalgamo, junto com alterações na seqüência sinalizadora. Um método preferido para a geração de seqüências sinalizadoras mutantes é a geração de

um "banco de códon" no começo da seqüência de codificação que não altera a seqüência de aminoácido da seqüência de sinalizadora (ou seja, as alterações são silenciosas). Esta pode ser realizada através da alteração da terceira posição de nucleotídeo de cada códon; adicionalmente, alguns aminoácidos, tais como leucina, serina, e arginina, possuem primeira e segunda posições múltiplas que podem adicionar complexidade na produção do banco. Dito método de mutagênese é descrito em detalhes em Yansura *et al.*, (1992), METHODS: *A Companion to Methods in Enzymol.*, 4:151-158.

Em um exemplo de realização, um conjunto de vetores é gerado com uma faixa de concentração de TIR para cada cístron presente. Este conjunto limitado fornece uma comparação dos níveis de expressão de cada cadeia bem como o rendimento dos produtos de comprimento total sob várias combinações de concentração de TIR. As concentrações de TIR podem ser determinadas pela quantificação do nível de expressão de um gene relatado como descrito em Simmons *et al.*, Patente US 5. 840.523. Com base na comparação da força de tradução, TIRs individuais desejadas são selecionadas para serem combinadas em construções de vetores de expressão da presente invenção.

Os procariontes apropriados para este propósito incluem arquebactéria e eubactérias, tais como organismos gram-negativos ou gram-positivos. Exemplos de bactérias úteis incluem *Escherichia* (por exemplo, *E. coli*), bacilos (por exemplo, *B. subtilis*), *Enterobactérias*, espécies de *Pseudomonas* (por exemplo, *Pseudomonas aeruginosa*), *Salmonella Typhimurium*, *Serratia marcescans*, *Klebsiella*, *Proteus*, *Shigella*, *Rhizóbia*, *Vitreoscilla* ou *Paracoccus*. Em um exemplo de realização, células gram-negativas são usadas. Em um exemplo de realização, células *E. coli* são usadas como hospedeiras para a invenção. Exemplos incluem cepas de *E. coli* cepa W3110 (Bachmann, Cellular and Molecular Biology, vol. 2 (Washington, D.C.: *American Society for Microbiology*, 1987), págs. 1190-1219; Depósito

ATCC No. 27325) e seus derivados, incluindo as cepas 33D3 possuindo os genótipos W3110 *ΔfhuA* (*ΔtonA*) *ptr3 lac Iq lacL8 ΔompT* Δ(*nmpc-fepE*) *degP41 kan*^{R} (Patente US 5.639.635). Outras cepas e seus derivados, tais como *E. coli* 294 (ATCC 31446), *E. coli* B, *E. coli* 1776 (ATCC 31537) e *E. coli* RV308 (ATCC 31608) também são adequadas. Estes são exemplos preferencialmente ilustrativos do que limitadores. Métodos para a construção de derivados de qualquer uma das bactérias acima mencionadas que possuem o genótipo definido são conhecidas no estado da técnica, por exemplo, em Bass *et al.*, *Proteins*, 8:309-314 (1990). Geralmente é necessário selecionar as bactérias adequadas levando em consideração a replicabilidade do *replicon* nas células bacterianas. Por exemplo, as espécies *E. coli*, *Serratia* ou *Salmonella* podem ser devidamente utilizadas como hospedeiras, quando plasmídeos bem conhecidos, tais como os plasmídeos pBR322, pBR325, pACYC177 ou pKN410 são utilizados para a construção do *replicon*. Normalmente a célula hospedeira deve secretar quantidades mínimas de enzimas proteolíticas, e adicionalmente inibidores de protease podem ser incorporadas na cultura celular.

PRODUÇÃO DE ANTICORPOS

As células hospedeiras são transformadas com os vetores de expressão descritos acima e cultivadas em meios nutrientes convencionais modificados conforme apropriado para a indução de promotores, seleção de transformadores ou amplificação dos genes que codificam as seqüências desejadas.

Transformação significa a introdução de DNA em hospedeiros eucarióticos a fim de que o DNA seja replicável, quer como um elemento extra-cromossômico ou integrado ao cromossomo. Dependendo da célula hospedeira utilizada, a transformação é feita utilizando técnicas padrão adequada para tais células. O tratamento com cálcio empregando cloreto de

cálcio é geralmente utilizado para células bacterianas que contêm parede celular. Outro método de transformação emprega polietileno-glicol / DMSO. Outra técnica ainda utilizada é eletroporação.

As células procarióticas utilizadas para produzir os polipeptídeos de acordo com a presente invenção são cultivadas em meios conhecidos na técnica e são apropriadas para cultivo das células hospedeiras selecionadas. Exemplos de meios apropriados incluem caldo lúria (LB) mais os suplementos nutrientes necessários. Em realizações preferidas, os meios também contêm um agente de seleção, selecionado com base na construção do vetor de expressão, para permitir seletivamente o crescimento de células procarióticas que contenham o vetor de expressão. A ampicilina é adicionada aos meios, por exemplo, para crescimento de células que expressam o gene resistente à ampicilina.

Quaisquer suplementos necessários além de fontes de carbono, nitrogênio e fosfato inorgânico podem também ser incluídos em concentrações apropriadas introduzidas isoladamente ou na forma de mistura com outro suplemento ou meio, tal como fonte de nitrogênio complexa. Opcionalmente, o meio de cultivo pode conter um ou mais agentes redutores selecionados a partir do grupo que consiste de glutationa, cisteína, cistamina, tioglicolato, ditioeritritol e ditiotreitol.

As células hospedeiras procarióticas são cultivadas sob temperaturas apropriadas. Para crescimento da *E. coli*, por exemplo, a temperatura preferida varia em cerca de 20 °C a 39 °C, de maior preferência entre 25 °C a 37 °C, e cerca de 30 °C. O pH do meio pode ser qualquer pH que entre 5 a 9, dependendo principalmente do organismo hospedeiro. Para a *E. coli*, o pH é preferencialmente cerca de 6,8 a 7,4, de preferencialmente é 7,0.

Se um promotor induzível é utilizado no vetor de expressão da invenção, a expressão da proteína é induzida em condições adequadas para a

ativação do promotor. Em um aspecto da invenção, promotores PhoA são usados para controlar a transcrição de polipeptídeos. Assim, as células são cultivadas em um meio limitante de fosfato para a indução. Em exemplo de realização, o meio limitante de fosfato é o meio C.R.A.P. (vide, por exemplo, Simmons *et al., J. Immunol. Methods.* (2002), 263:133-147). Uma variedade de outros indutores pode ser utilizada, de acordo com o vetor de construção utilizado, como é conhecido no estado da técnica.

Em um exemplo de realização, os polipeptídeos da presente invenção expressos são secretados e recuperados do periplasma das células hospedeiras. A recuperação de proteína envolve tipicamente o rompimento do microorganismo, geralmente por métodos como choque osmótico, sonicação ou lise. Após o rompimento das células, fragmentos celulares ou células inteiras podem ser removidas por meio de centrifugação ou filtragem. As proteínas podem ser adicionalmente purificadas, por exemplo, por cromatografia de resina de afinidade. Alternativamente, as proteínas podem ser transportadas para o meio de cultivo e nele isoladas. As células podem ser removidas do cultivo e o sobrenadante de cultivo filtrado e concentrado para purificação adicional do polipeptídeo produzido. Os polipeptídeos expressos podem ser adicionalmente isolados e identificados utilizando métodos comumente conhecidos, tais como eletroforese de gel de poliacrilamida (PAGE) e teste *Western Blot*.

Em um aspecto da invenção, o anticorpo pode ser produzido em grande quantidade por meio de processos de fermentação. Vários procedimentos de fermentação de alimentação de lotes em larga escala são disponíveis para a produção de proteínas recombinantes. Os fermentadores de larga escala possuem capacidade de pelo menos 1000 litros, preferencialmente de 1000 a 100.000 litros de capacidade. Estes fermentadores utilizam impulsionadores agitadores ou outros meios apropriados para distribuir

oxigênio e nutrientes, especialmente glicose (uma fonte de carbono e energia comum). A fermentação em pequena escala refere-se geralmente a fermentação em fermentador que possui capacidade volumétrica de não mais de cerca de 100 litros e pode variar de cerca de um 1 litro a 100 litros.

Em processo de fermentação, a indução da expressão de proteína é tipicamente iniciada após o crescimento das células sob condições apropriadas até densidade desejada, tal como OD_{550} de cerca de 180 a 220 no qual as células estão no início da fase estacionária. Uma série de indutores pode ser utilizada, de acordo com a construção de vetor empregado, como é conhecido no estado da arte e descrito acima. As células podem ser cultivadas por períodos mais curtos antes da indução. As células são normalmente induzidas por cerca de 12 a 50 horas, embora possa ser utilizado um tempo maior ou menor de indução.

Para aumentar adicionalmente o rendimento de produção e a qualidade do polipeptídeo da presente invenção, várias condições de fermentação podem ser transformadas. Para melhorar a montagem e do anticorpo secretado, por exemplo, vetores adicionais que superexpressam proteínas chaperonas, tais como proteínas Dsb (DsbA, DsbB, DsbC, DsbD e/ou DsbG) ou FkpA (peptidilprolil cis, trans-isomerase com atividade de chaperona), podem ser utilizados para co-transformar as células procarióticas hospedeiras. Demonstrou-se que as proteínas de chaperona facilitam a formação de dobradiça e solubilidade adequadas de proteínas heterólogas produzidas em células hospedeiras bacterianas. Chen *et al, J. Bio. Chem.*, 274: 19601-19605 (1999); Patentes US 6.083.715 e 6.027.888; Bothmann e Pluckthun, *J. Biol. Chem.*, 275: 17100-17105 (2000); Ramm e Pluckthun, *J. Biol. Chem.*, 275: 17106-17113 (2000); Arie *et al, Mol. Microbiol.*, 39: 199-210 (2001).

Para minimizar a proteólise de proteínas heterólogas expressas (especialmente as que são proteoliticamente sensíveis) tal como em células

hospedeiras procarióticas, certas linhagens hospedeiras com deficiência para enzimas proteolíticas podem ser utilizadas para a presente invenção. Linhagens de células hospedeiras procarióticas podem ser modificadas, por exemplo, para efetuar mutação(ões) genética(s) nos genes que codificam proteases bacterianas conhecidas, tais como Protease III, OmpT, DegP, Tsp, TonA, PhoA, Protease I, Protease Mi, Protease V, Protease VI e suas combinações. Algumas linhagens de *E. Coli* com deficiência de protease são disponíveis e descritas, por exemplo, em Joly *et al,* (1998) *supra*; Georgiou *et al.* Patente US 5.264.365, Georgiou *et al.* Patente US 5.508.192; Hara *et al, Microbial Drug Resistance*, 2:63-72 (1996).

Em um exemplo de realização, as cepas de *E. coli* deficientes de enzimas proteolíticas e transformadas em com um ou mais plasmídeos que superexpressam proteínas chaperonas são utilizados como células hospedeiras no sistema de expressão da invenção.

PURIFICAÇÃO DE ANTICORPO

Em um exemplo de realização, a proteína de anticorpo produzida no presente pode ser adicionalmente purificada para se obter preparações que são consideravelmente homogêneas para ensaios e usos adicionais. Os procedimentos a seguir são exemplos de procedimentos de purificação apropriados: através de fracionamento em uma coluna de troca iônica; precipitação em etanol, HPLC de fase reversa; cromatografia em sílica ou em uma resina de troca catiônica tal como DEAE; cromatofocusação; SDS-PAGE; precipitação em sulfato de amônio; gel filtração utilizando, por exemplo, Sephadex G-75.

Em um aspecto, a proteína A imobilizada por uma fase sólida é utilizada para a purificação por imunoafinidade do anticorpo da invenção. A proteína A é um proteína da parede celular de 41kD do *Staphylococcus aureos* que se liga com alta afinidade a região Fc dos anticorpos. Lindmark, *et al.*

(1983) *J. Immunol. Meth.* 62:1-13. A fase sólida para o qual a proteína A é imobilizada pode ser uma coluna que compreende uma superfície de vidro ou de sílica, ou uma coluna de vidro porosa controlada ou coluna de ácido silícico. Em algumas aplicações, a coluna é revestida com um reagente, tal como o glicerol, possivelmente para evitar a aderência inespecífica de contaminantes.

Assim como a primeira etapa de purificação, a preparação derivada da cultura celular, como descrito acima pode ser aplicada a uma proteína A imobilizada em fase sólida para permitir a ligação do anticorpo específico de interesse à proteina A. A fase sólida passaria então a ser lavada para remover os contaminantes não ligados especificamente à fase sólida. Por último, o anticorpo de interesse é recuperado da fase sólida por eluição.

PRODUÇÃO DE ANTICORPO UTILIZANDO CÉLULAS HOSPEDEIRAS EUCARIÓTICAS

Os componentes do vetor geralmente incluem, mas sem se limitar a, um ou mais dos seguintes: uma seqüência sinalizadora, uma origem de replicação, um ou mais genes marcadores, um componente amplificador, um promotor, e uma seqüência de terminação da transcrição.

(I) COMPONENTE DE SEQÜÊNCIA SINALIZADORA

Um vetor para uso em uma célula hospedeira eucariótica também pode conter uma seqüência sinalizadora ou outro polipeptídeo que possuí um sítio de clivagem específico no N-terminal da proteína ou polipeptídeo maduro de interesse. A seqüência sinalizadora heteróloga selecionada geralmente é aquela que é reconhecida e processada (ou seja, clivada por uma peptidase sinalizadora) pela célula hospedeira. Em células de expressão de mamíferos, estão disponíveis as seqüências sinalizadora de mamíferos, bem como líderes de secreção viral, tais como o sinal gD da herpes simplex.

O DNA para essa região precursora é ligado em estrutura de leitura a DNA codificador do anticorpo.

(II) COMPONENTE DE ORIGEM DE REPLICAÇÃO

Geralmente, a origem do componente de replicação não é necessária para vetores de expressão em mamíferos. Por exemplo, a origem SV40 pode ser tipicamente utilizada somente porque contém o promotor inicial.

(III) COMPONENTE GENÉTICO DE SELEÇÃO

Os vetores de clonagem e de expressão podem conter um gene de seleção, também denominado marcador de seleção. Os genes de seleção típicos codificam proteínas que (a) conferem resistência a antibióticos ou outras toxinas, tais como ampicilina, neomicina, metotrexato ou tetraciclina; (b) complementam deficiências autotróficas; ou (c) suplementam nutrientes fundamentais não-disponíveis no meio.

Um exemplo de esquema de seleção utiliza uma droga para interromper o crescimento de uma célula hospedeira. As células que são transformadas com sucesso com um gene heterólogo que produz uma proteína que confere resistência a drogas e, desta forma, sobrevivem ao regime de seleção. Exemplos de tal seleção dominante utilizam as drogas neomicina, ácido micofenólico e higromicina.

Outro exemplo de marcadores de seleção apropriados para células de mamíferos são os que permitem a identificação de células competentes para a absorção do ácido nucléico de anticorpo, tal como DHFR, timidina quinase, metalotioneína-I e II, preferencialmente genes metalotioneína de primatas, adenosina deaminase, ornitina decarboxilase, e etc.

Células transformadas com o gene de seleção DHFR, por exemplo, são identificadas, em primeiro lugar, através do cultivo de todos os transformantes em um meio de cultura que contenha metotrexato (Mtx), antagonista concorrente de DHFR. Uma célula hospedeira apropriada, ao empregar-se DHFR do tipo selvagem, é a linhagem celular de ovário de hamster chinês (CHO) com deficiência na atividade de DHFR (por exemplo,

ATCC CRL-9096).

Alternativamente, as células hospedeiras (particularmente, hospedeiros do tipo selvagem que contêm DHFR endógeno) transformadas ou co-transformadas com seqüências de DNA que codificam o anticorpo DHFR do tipo selvagem e outro marcador selecionável tal como aminoglicosídeo 3'-fosfotransferase (APH) podem ser selecionadas através de crescimento celular em um meio que contém um agente de seleção para o marcador selecionável tal como antibiótico aminoglicosídico, por exemplo canamicina, neomicina ou G418. Vide a Patente US 4.965.199.

(IV) COMPONENTE PROMOTOR

Os vetores de clonagem e de expressão normalmente contêm um promotor que é reconhecido pelo organismo hospedeiro e é operacionalmente ligado ao ácido nucléico do polipeptídeo (por exemplo, um anticorpo). As seqüências promotoras de eucariotos são conhecidas. São conhecidas seqüências promotoras para eucariontes. Virtualmente todos os genes eucariontes possuem uma região rica em AT localizada a cerca de 25 a 30 bases a montante do sítio em que se inicia a transcrição. Outra seqüência encontrada a 70 até 80 bases a montante do início da transcrição de muitos genes é uma região CNCAAT, em que N pode ser qualquer nucleotídeo. Na extremidade 3' da maioria dos genes eucariontes, encontra-se uma seqüência AATAAA que pode ser o sinal para adição da cauda poli-A na extremidade 3' da seqüência codificadora. Todas essas seqüências são inseridas de forma apropriada em vetores de expressão para eucariotos.

A transcrição de polipeptídeos a partir de vetores em células hospedeiras de mamíferos é controlada, por exemplo, por promotores obtidos a partir do genoma viral, tal como, o vírus de polioma, vírus da catapora, adenovírus (tal como. Adenovírus 2), vírus de papiloma bovino, vírus de sarcoma aviário, citomegalovírus, retrovírus, vírus da hepatite B e,

preferencialmente, o Vírus Símio 40 (SV40), a partir de promotores de mamíferos heterólogos, tais como o promotor de actina ou um promotor de imunoglobulina, de promotores de choque térmico, desde que esses promotores sejam compatíveis com os sistemas de células hospedeiras.

O promotor inicial e final do vírus SV40 são obtidos convenientemente na forma de fragmento de restrição SV40 que também contém a origem viral SV40 de replicação. O promotor inicial imediato do citomegalovírus humano é obtido convenientemente na forma de fragmento de restrição HindIII E. Um sistema de expressão de DNA em hospedeiros mamíferos utilizando o vírus de papiloma bovino como vetor é descrito na Patente US 4.119.446. Uma modificação deste sistema é descrita na Patente US 4.601.978. Vide também Reyes *et al., Nature* 297: 598-601 (1982) sobre a expressão de cDNA de interferon-β humano em células de camundongos sob o controle de um promotor timidina quinase de vírus da herpes simplex. Alternativamente, a repetição terminal longa de vírus do sarcoma de Rous pode ser utilizada como promotor.

(V) COMPONENTE ELEMENTO AMPLIFICADOR

A transcrição de um DNA codificador do polipeptídeo do anticorpo de acordo com a presente invenção por eucariontes superiores é freqüentemente aumentada através da inserção de uma seqüência amplificadora no vetor. Muitas seqüências amplificadoras são agora conhecidas de genes de mamíferos (globina, elastase, albumina, α-fetoproteína e insulina). Tipicamente, entretanto, será utilizado um amplificador de um vírus de célula eucariótica. Exemplos incluem o amplificador SV40 sobre o lado posterior da origem de replicação (bp 100-270), o amplificador promotor inicial de citomegalovírus, o amplificador de polioma sobre o lado terminal da origem de replicação e amplificadores de adenovírus. Vide também Yaniv, *Nature* 297: 17-18 (1982) sobre elementos de promoção para a ativação de promotores

eucarióticos. O amplificador pode também sofrer *splicing* no vetor na posição 5' ou 3' para a seqüência codificadora de anticorpo, mas encontra-se localizado, preferencialmente, em um sítio a 5' do promotor.

(VI) COMPONENTE DE TÉRMINO DE TRANSCRIÇÃO

Os vetores de expressão utilizados em células hospedeiras eucariontes também irão conter seqüências necessárias para a terminação da transcrição e estabilização do mRNA. Ditas seqüências são normalmente disponíveis a partir das regiões 5' e, ocasionalmente 3' não-traduzidas do DNA ou cDNA viral ou de eucariontes. Estas regiões contêm segmentos de nucleotídeos transcritos na forma de fragmentos poliadenilados na porção não-traduzida do mRNA codificador do anticorpo. Um componente de terminação de transcrição útil é a região de poliadenilação do hormônio de crescimento bovino. Vide o documento WO 94/11026 e o vetor de expressão nele descrito.

(VII) SELEÇÃO E TRANSFORMAÇÃO DE CÉLULAS HOSPEDEIRAS

As células hospedeiras apropriadas para clonagem ou expressão do DNA nos vetores do presente incluem as células eucarióticas superiores descritas neste documento, incluindo células hospedeiras de vertebrados. Propagação de células hospedeiras de vertebrados em cultura (cultura de tecido) tornou-se um procedimento rotineiro. Exemplos de linhagens de células hospedeiras de mamíferos úteis são a linhagem CV1 de rim de macaco transformada por SV40 (COS-7, ATCC CRL 1651); linhagem de rim embriônico humano (293 ou células 293 sub-clonadas para crescimento em cultura de suspensão, Graham *et al.*, *J. Gen. Virol.* 36: 59 (1977)); células de rim de filhote de hamster (BHK, ATCC CCL 10); células de ovário de hamster chinês/-DHFR (CHO, Urlaub *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 77: 4216 (1980)); células sertoli de camundongo (TM4, Mather, *Biol. Reprod.* 23: 243-251 (1980)); células de rim de macaco (CV1 ATCC CCL 70); células de rim de macaco verde africano (VERO-76, ATCC CRL-1587); células de carcinoma cervical humano (HELA,

ATCC CCL 2); células de rim canino (MDCK, ATCC CCL 34); células de fígado de *buffalo rat* (BRL 3A, ATCC CRL 1442); células de pulmão humano (W138, ATCC CCL 75); células de fígado humano (Hep G2, HB 8065); tumor mamário de camundongo (MMT 060562, ATCC CCL51); células TRI (Mather *et al.*, *Annals N. Y. Acad. Sci.* 383:44-68 (1982)); células MRC 5; células FS4; linhagem de hepatoma humano (Hep G2).

As células hospedeiras são transformadas com os vetores de clonagem ou expressão descritos acima para a produção de anticorpos e cultivadas em meios nutrientes convencionais modificados conforme apropriado para a indução de promotores, seleção de transformantes ou amplificando os genes codificadores das seqüências desejadas.

(VIII) CULTIVO DAS CÉLULAS HOSPEDEIRAS

As células hospedeiras utilizadas para a produção do anticorpo de acordo com a presente invenção podem ser cultivadas em uma série de meios disponíveis comercialmente, tais como meio de Ham F10 (Sigma), Meio Essencial Mínimo ((MEM), Sigma), RPMI-1640 (Sigma) e Meio Eagle Modificado da Dulbecco ((DMEM), Sigma) que são apropriados para o cultivo das células hospedeiras. Além disso, qualquer meio descrito em Ham *et al.*, *Meth. Enz.* 58: 44 (1979), Barnes *et al., Anal. Biochem.* 102: 255 (1980), Patentes US 4.767.704; US 4.657.866; US 4.927.762; US 4.560.655; ou US 5.122.469; documentos WO 90/03430 e WO 87/00195 ou o pedido de Patente US 30.985 podem ser utilizados como meios de cultura para as células hospedeiras. Qualquer destes meios pode ser suplementado conforme necessário com hormônios e/ou outros fatores do crescimento (tais como insulina, transferrina ou fator de crescimento epidérmico), sais (tais como cloreto de sódio, cálcio, magnésio e fosfato), tampões (tais como HEPES), nucleotídeos (tais como adenosina e timidina), antibióticos (tal como a droga GENTAMICINA®), elementos de traço (definidos como compostos inorgânicos

normalmente presentes em concentrações finais na faixa micromolar) e glicose ou uma fonte de energia equivalente. Qualquer outro suplemento necessário pode também ser incluído em concentrações apropriadas conhecidas dos técnicos no assunto. As condições de cultura, tais como temperatura, pH e similares, são as utilizadas anteriormente com a célula hospedeira selecionada para expressão e serão evidentes para os técnicos no assunto.

(IX) PURIFICAÇÃO DO ANTICORPO

Quando ao uso de técnicas recombinantes, o anticorpo pode ser produzido de forma intracelular, no espaço periplasmático ou secretado diretamente no meio. Caso o anticorpo seja produzido de forma intracelular, como uma primeira etapa, os fragmentos particulados, sejam eles células hospedeiras ou fragmentos lisados, são removidos, por exemplo, através de centrifugação ou ultrafiltragem. Quando o anticorpo for secretado para o meio, sobrenadantes desses sistemas de expressão são geralmente concentrados em primeiro lugar utilizando um filtro de concentração de proteínas disponível comercialmente, por exemplo, uma unidade de ultrafiltragem Amicon ou Millipore Pellicon. Um inibidor de protease, tal como PMSF, pode ser incluído em qualquer das etapas acima para inibir a proteólise e antibióticos podem ser incluídos para evitar o crescimento de contaminantes imprevistos.

A composição de anticorpo preparada a partir das células pode ser purificada através do uso, por exemplo, de cromatografia de hidroxilapatita, eletroforese em gel, diálise e cromatografia de afinidade, com cromatografia de afinidade sendo a técnica de purificação preferida. A adequação da proteína A como ligante de afinidade depende da espécie e do isotipo de qualquer domínio Fc de imunoglobulina que esteja presente no anticorpo. A Proteína A pode ser utilizada para purificar anticorpos que se baseiem em cadeias pesadas $\gamma 1$, $\gamma 2$ ou $\gamma 4$ humanas (Lindmark *et al., J. Immunol. Meth.* 62: 1-13 (1983)). Recomenda-se Proteína G para todos os isotipos de camundongos e

para γ3 humano (Guss *et al., EMBO J.* 5: 1567-1575 (1986)). A matriz à qual é ligado o ligante de afinidade é mais freqüentemente agarose, mas outras matrizes são disponíveis. Matrizes mecanicamente estáveis, tais como vidro de poros controlados ou poli-(estirenodivinil)-benzeno, permitem velocidades de fluxo maiores e tempos de processamento mais curtos do que os que podem ser atingidos com agarose. Quando o anticorpo compreender um domínio C_H3, a resina Bakerbond ABX™ (J. T. Baker, Phillipsburg NJ, Estados Unidos) é útil para purificação. Outras técnicas de purificação de proteínas, tais como fracionamento sobre uma coluna de troca iônica, precipitação em etanol, HPLC de Fase Reversa, cromatografia em sílica, cromatografia em heparina SEPHAROSE™, cromatografia em uma resina de troca aniônica ou catiônica (tal como uma coluna de ácido poliaspártico), cromatofocagem, SDS-PAGE e precipitação de sulfato de amônio também são disponíveis, dependendo do anticorpo a ser recuperado.

Após qualquer etapa(s) de purificação preliminar(es), a mistura que compreende o anticorpo de interesse e contaminantes pode ser submetida a cromatografia de interação hidrofóbica a baixo pH utilizando uma eluição tamponada a um pH de cerca de 2,5 a 4,5, Em um exemplo de realização específico, preferencialmente realizada, a cromatografia de interação hidrofóbica a baixo pH é realizada sob baixas concentrações de sal (como, cerca de 0 a 0,25 M de sal).

ENSAIOS DE ATIVIDADE

As imunoglobulinas da presente invenção podem ser caracterizadas por suas propriedades físicas/químicas e funções biológicas através de diversos ensaios conhecidos no estado da técnica.

Os anticorpos purificados podem ser adicionalmente caracterizados por uma série de ensaios incluindo, mas sem limitar-se a, seqüenciamento N-terminal, análise de aminoácido, cromatografia líquida de

alta pressão (HPLC) com exclusão de tamanho não-desnaturante, espectometria em massa, cromatografia de troca iônica, e digestão de papaína.

Em exemplos de realização específicos, as imunoglobulinas produzinas no presente são analisadas pelas suas atividades biológicas. Em algumas realizações, as imunoglobulinas da presente invenção são testadas por sua atividade de ligação ao antígeno. Os ensaios de ligação de antígeno que são conhecidos no estado da técnica e podem ser utilizados no presente incluem, sem se limitar a, ensaio de ligação competitivo ou direta utilizando técnicas tais como *Western blots*, radioimunoensaios, ELISA (ensaio imunoabsorvente ligado por enzima), imunoensaios do tipo "sanduíche", ensaios de imunoprecipitação, imunoensaios fluorescentes, e imunoensaios de proteína A.

Os anticorpos ou fragmentos ligante de antígenos ainda podem ser selecionados por suas atividades funcionais, por exemplo, atividade agonista ou antagonista. Por exemplo, anticorpos anti-HER-2 podem ser selecionados pela capacidade de inibir a fosforilação da tirosina em HER-2, inibir a proliferação de células cancerosas ou de induzir células cancerosas à apoptose. Ensaios para identificar e mesurar essas atividades são descritas, por exemplo, no documento W098/17797.

Além disso, anticorpos anti-DR5 podem ser selecionados pela capacidade de induzir a apoptose em células cancerosas e/ou inibir a função das células inflamatórias. Em outros exemplos de realização, anticorpos anti-DR5 são selecionados pela capacidade de competir com o DR5 pela ligação ao Apo-2L. Em outros exemplos de realização, anticorpos anti-DR5 humano são selecionados pela ligação ao DR5 murino e/ou DR5 de macacos cinomolgos. Ensaios para se determinar a atividade biológica podem ser realizados por meio de métodos conhecidos no estado da técnica, como a fragmentação de DNA (vide, por exemplo, Marsters *et al., Curr. Biology,* 6:1669 (1996)),

inativação da caspase, ligação ao DR5 (vide, por exemplo, documento WO 98/51793, publicado em 19 de Novembro de 1998. O nível de apoptose pode ser mensurada através da identificação da condensação do citoplasma, perda das micro vilosidades da membrana plasmática, segmentação do núcleo, degradação do DNA cromossômico ou perda da função mitocondrial. Esta atividade pode ser determinada e mensurada, por exemplo, por ensaios de viabilidade celular (tal como o ensaio com *Alamar blue* ou ensaios MTT), análise por FACS, ativação da caspase, fragmentação do DNA (vide, por exemplo, Nicoletti *et al.*, *J. Immunol. Methods*, 139: 271-279 (1991), e polimerase ribose poli-ADP, clivagem de "PARP" e ensaios conhecidos no estado da técnica.

Em um exemplo de realização, como o ensaio para a apoptose envolve a realização de duas vezes as diluições seriais do controle padrão e do anticorpo anti-DR5 em placas de cultura de 96 poços. O Apo-2 ligante (aminoácidos 114-281, descrito na PCT US 00/17579) é testada para efeitos de comparação. Colo-205 (20000 células ~ poço) com células de carcinoma de cólon humano (ATCC) são semeadas em placas de 96 poços. As placas são incubadas a 37°C por 24 horas. *AlamazBlue* (*Trek Diagnostic Systems, Inc.*) é adicionado aos poços nas últimas 3 a 24 horas do tempo de incubação. A fluorescência é lida utilizando um fluorômetro para placas de 96 poços utilizando o comprimento de onda para a excitação de 530 nm e de emissão a 590 nm. Os resultados são expressos como unidades de fluorescência relativa (RFU).

Em um exemplo de realização, a invenção contempla um anticorpo modificado que possuí alguma, mas não todas as funções efetoras, que torna este anticorpo um candidato desejável para muitas aplicações no qual a meia vida do anticorpo *in vivo* é importante ainda que certas funções efetoras (como complemento e ADCC) são desnecessárias ou prejudiciais. Em certos exemplos de realização, as atividades Fc do anticorpo são medidas para

assegurar que só as propriedades desejadas sejam mantidas. Um ensaio de citotoxicidade *in vitro* ou *in vivo* pode ser conduzido para confirmar a redução / depleção dos CDC e/ou atividades ADCC. Por exemplo, ensaios de ligação com o receptor Fc (FcR) podem ser realizados a fim de garantir que o anticorpo não tenha ligação ao FcγR (e portanto carece da atividade ADCC), mas mantém a capacidade de ligação ao FcRn. As células primárias para a mediação de ADCC, células NK, expressam unicamente FcγRIII, enquanto monócitos expressam FcγRI, FcγRII e FcγRIII. A expressão de FcR sobre células hematopoiéticas é resumida na Tabela 3, pág. 464, de Ravetch e Kinet, *Annu. Rev. Immunol.* 9: 457-92 (1991). Um exemplo de ensaio para se determinar a atividade de ADCC de uma molécula de interesse, está descrito na Patente US 5.500.362 ou US 5.821.337. Células efetoras úteis para esses testes incluem células mononucleares sangüíneas periféricas (PBMC) e células Natural Killers (NK). Alternativa ou adicionalmente, a atividade de ADCC da molécula de interesse pode ser determinada *in vivo*, tal como em um modelo animal como o descrito em Clynes *et al., PNAS (USA)* 95: 652-656 (1998). Ensaios de ligação de C1q também podem ser realizados para confirmar que o anticorpo é incapaz de se ligar a C1q e, portanto, carece de atividade CDC. Para determinar a ativação do complemento, pode ser realizado um ensaio CDC, conforme descrito, por exemplo, em Gazzano-Santoro *et al., J. Immunol. Methods*, 202: 163 (1996). A determinação da ligação de FcRn e a depuração/ meia vida *in vivo* também pode ser realizada utilizando métodos conhecidos no estado da técnica, por exemplo, aqueles descritos na seção Exemplos.

ANTICORPOS HUMANIZADOS

A invenção abrange anticorpos humanizados. Vários métodos de humanização de anticorpos não-humanos são conhecidos no estado da técnica. Preferencialmente, um anticorpo humanizado contém um ou mais resíduos de aminoácidos nele introduzidos a partir de uma fonte que não é

humana. Esses resíduos de aminoácidos não-humanos são muitas vezes denominados resíduos "importados", que são tipicamente retirados de um domínio variável "importado". A humanização pode ser essencialmente realizada seguindo-se o método de Winter *et al.* (Jones *et al.*, *Nature*, 321:522-525 (1986); Riechmann *et al.*, *Nature*, 332:323-327 (1988); Verhoeyen *et al.*, *Science*, 239:1534-1536 (1988)), por meio de substituição de seqüências de regiões hipervariáveis pelas seqüências correspondentes de anticorpo humano. Conseqüentemente, esses anticorpos "humanizados" são anticorpos quiméricos (Patente US 4.816.567), em que substancialmente menos de um domínio variável humano intacto tenha sido substituído pela seqüência correspondente de uma espécie não-humana. Na prática, os anticorpos humanizados são tipicamente anticorpos humanos, em que alguns resíduos de regiões hipervariáveis e possivelmente alguns resíduos de FR são substituídos por resíduos de sítios análogos em anticorpos de roedores.

A seleção de domínios variáveis humanos, tanto leves quanto pesados, a serem utilizados na fabricação dos anticorpos humanizados é muito importante para reduzir a antigenicidade. De acordo com o chamado método de "melhor adequação" (*best-fit*), a seqüência do domínio variável de um anticorpo de roedor é selecionada em comparação com toda a biblioteca de seqüências de domínio variável humanas conhecida. A seqüência humana que é mais próxima da seqüência do roedor é então aceita como a região estrutural humana (FR) para o anticorpo humanizado (Sims *et al.*, (1993)*J. Immunol.*, 151: 2296; Chothia *et al.*, (1987) *J. Mol. Biol.*, 196: 901). Outro método utiliza uma região estrutural específica derivada da seqüência de consenso de todos os anticorpos humanos de um subgrupo específico de cadeias leves ou pesadas. A mesma estrutura pode ser utilizada para vários anticorpos humanizados diferentes (Carter *et al.*, (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89: 4285; Presta *et al.*, (1993) *J. Immunol.*, 151: 2623).

É adicionalmente importante que os anticorpos sejam humanizados com retenção de alta afinidade para o antígeno e outras propriedades biológicas favoráveis. Para atingir este objetivo, de acordo com um método preferido, os anticorpos humanizados são preparados por meio de um processo de análise das seqüências parentais e diversos produtos humanizados conceituais, utilizando modelos tri-dimensionais da seqüência parental e humanizada. Modelos de imunoglobulina tridimensionais são comumente disponíveis e familiares para os técnicos no assunto. São disponíveis programas de computador que ilustram e exibem prováveis estruturas de conformação tridimensional de seqüências de imunoglobulina candidata selecionadas. A inspeção dessas exibições permite a análise do papel provável dos resíduos no funcionamento da seqüência de imunoglobulina candidata, ou seja, a análise dos resíduos que influenciam a capacidade da imunoglobulina candidata de ligar o seu antígeno. Desta forma, os resíduos de FR podem ser selecionados e combinados a partir das seqüências receptora e importada, de forma que seja atingida a característica desejada do anticorpo, tal como maior afinidade para o(s) antígeno(s) desejado(s). Geralmente, os resíduos da região hipervariável são diretamente e mais substancialmente envolvidos na influência da ligação aos antígenos.

ANTICORPOS VARIANTES

Em um aspecto, a invenção fornece anticorpos possuem modificações na interface dos polipeptídeos Fc que compreendem a região Fc, onde as modificações facilitam e/ou promovem a heterodimerização. Estas alterações incluem a introdução de uma protuberância em um primeiro polipeptídeo Fc e uma cavidade em um segundo polipeptídeo de Fc, onde a protuberância é posicionada na cavidade de modo a promover o complexo entre o primeiro e segundo polipeptídeo de Fc. Métodos para produção de anticorpos com estas modificações são conhecidas no estado da técnica, por

exemplo, como descrito na Patente US 5.731.168.

Em alguns exemplos, é(são) contemplada(s) modificação(ões) na(s) seqüência(s) de aminoácido(s) dos anticorpos aqui descritos. Por exemplo, pode ser desejável melhorar a afinidade de ligação e/ou outras propriedades biológicas do anticorpo. Variantes da seqüência de aminoácido do anticorpo são preparados pela introdução de nucleotídeos adequados modificando o ácido nucléico do anticorpo, ou pela síntese de peptídeo. Tais alterações incluem, por exemplo, deleção, e/ou inserção e/ou substituição, de resíduos dentro das seqüências de aminoácido do anticorpo. Qualquer combinação de deleção, inserção ou substituição podem ser feitas para se chegar a construção final, desde que o produto final tenha as características desejadas. As alterações nos aminoácidos podem ser introduzidas no anticorpo no momento em que seqüência é feita.

Para aumentar a meia vida do anticorpo ou polipeptídeo contendo a seqüência de aminoácido desta invenção, pode-se incorporar um epítopo de ligação de recuperação do receptor recuperado ao anticorpo (especialmente um fragmento de anticorpo), conforme descrito, por exemplo, na Patente US 5.739.277. Por exemplo, uma molécula de ácido nucléico que codifica um epítopo de ligação de recuperação do receptor pode ser ligado em uma moldura de um ácido nucléico que codifica uma seqüência de polipeptídeo da presente invenção de modo a que a proteína de fusão expressas pelas moléculas de ácido nucléico desenvolvida contém o epítopo de ligação de recuperação do receptor e uma seqüência do polipeptídeo da presente invenção. Da forma como utilizada no presente, a expressão "epítopo de ligação de recuperação do receptor" designa um epítopo da região Fc de uma molécula de IgG (por exemplo, IgG_1, IgG_2, IgG_3 ou IgG_4) que é responsável pelo aumento da meia vida em soro *in vivo* da molécula de IgG. Alternativamente ou adicionalmente, um

aumento ou diminuição da meia vida no soro pela alteração da seqüência de aminoácidos da região Fc de um anticorpo para gerar variantes com ligações do FcRn alterados. Anticorpos com ligações FcRn alterados e/ou alterações na meia vida são descritos no documento WO 00/42072 (Presta, L.). WO 02/060919; Shields, R. L, *et al.*, (2001) *JBC* 276(9):6591-6604; Hinton, P. R., (2004) *JBC* 279(8):6213-6216). Em outro exemplo de realização, a meia vida sérica também pode ser aumentada, por exemplo, pela junção de outras seqüências polipeptídicas. Por exemplo, anticorpos desta invenção ou outro polipeptídeo contendo as seqüências de aminoácidos esta invenção pode ser anexado à albumina ou uma porção da albumina que se liga aos receptores FcRn ou um peptídeo que se liga a albumina, para que se liga à albumina do soro, por exemplo, essas seqüências polipeptídicas são divulgados no documento WO01/45746. Em um exemplo de realização, o peptídeo da albumina a ser acoplado compreende a seqüência de aminoácidos DICLPRWGCLW (SEQ ID No: 608). Em outro exemplo de realização, a meia-vida de um Fab de acordo com esta invenção é aumentada por estes métodos. Vide também, Dennis, M. S., *et al*, (2002) *JBC* 277(38):35035-35043 para seqüências de peptídeo que se ligam a albumina.

Um método útil de identificação de certos resíduos ou regiões do antagonista que são locais preferidos para mutagênese é denominado "mutagênese de varredura de alanina", conforme descrito por Cunningham e Wells, *Science*, 244: 1081-1085 (1989). Aqui, um resíduo ou grupo de resíduos alvo é identificado (por exemplo, resíduos carregados, tais como arg, asp, his, lys e glu) e substituído por um aminoácido neutro ou negativamente carregado (de maior preferência alanina ou polialanina) para afetar a interação dos aminoácidos com antígeno. Esses locais de aminoácidos que demonstram sensibilidade funcional às substituições são refinados em seguida pela

introdução de outras variantes ou variantes adicionais nos sítios de substituição ou para estes. Desta forma, embora o sítio para introdução de uma variação de seqüência de aminoácidos seja previamente determinado, a natureza intrínseca da mutação não necessita ser previamente determinada. Para analisar o desempenho de uma mutação em um dado sítio, por exemplo, varredura de ala ou mutagênese aleatória é conduzida no códon ou região alvo e as variantes de antagonistas expressas são selecionadas para a atividade desejada.

As inserções de seqüências de aminoácidos incluem fusões de carbóxi e/ou amino-terminal que variam de comprimento de uns resíduos até polipeptídeos que contenham cem ou mais resíduos, bem como inserções intra-seqüenciais de resíduos de aminoácidos isolados ou múltiplos. Exemplos de inserções terminais incluem um antagonista com um resíduo de metionila N-terminal ou o anticorpo fundido a um polipeptídeo citotóxico. Outras variantes de inserção da molécula de anticorpo incluem a fusão ao N- ou C-terminal do anticorpo (por exemplo, para ADEPT) de uma enzima ou um polipeptídeo que aumente a meia vida do antagonista no soro.

Outro tipo de variante é uma variante de substituição de aminoácidos. Estas variantes contêm pelo menos um resíduo de aminoácido na molécula de anticorpo substituída por um resíduo diferente. Os sítios de maior interesse para mutagênese de substituição incluem as regiões hipervariáveis, mas também são contempladas alterações de FR. Substituições conservadoras são exibidas na Tabela 2 sob o título de "substituições preferidas". Caso essas substituições resultem em mudança da atividade biológica, então mudanças mais substanciais, denominadas "exemplos de substituições" na Tabela abaixo, ou conforme descrito adicionalmente abaixo com referência a classes de aminoácidos podem ser

introduzidas e os produtos são selecionados.

TABELA 2

Resíduo original	Exemplos de substituições	Substituições preferidas
Ala (A)	Val; Leu; Ile	Val
Arg (R)	Lys; Gln; Asn	Lys
Asn (N)	Gln; His; Asp, Lys; Arg	Gln
Asp (D)	Glu; Asn	Glu
Cys (C)	Ser; Ala	Ser
Gln (Q)	Asn; Glu	Asn
Glu (E)	Asp; Gln	Asp
Gly (G)	Ala	Ala
His (H)	Asn; Gln; Lys; Arg	Arg
Ile (I)	Leu; Val; Met; Ala; Phe; Norleucina	Leu
Leu (L)	Norleucina; Ile; Val; Met; Ala; Phe	Ile
Lys (K)	Arg; Gln; Asn	Arg
Met (M)	Leu; Phe; Ile	Leu
Phe (F)	Trp; Leu; Val; Ile; Ala; Tyr	Tyr
Pro (P)	Ala	Ala
Ser (S)	Thr	Thr
Thr (T)	Val; Ser	Ser
Trp (W)	Tyr; Phe	Tyr
Tyr (Y)	Trp; Phe; Thr; Ser	Phe
Val (V)	Ile; Leu; Met; Phe; Ala; Norleucina	Leu

Modificações substanciais das propriedades biológicas do anticorpo são atingidas por meio da seleção de substituições que diferem significativamente no seu efeito sobre a manutenção (a) da estrutura da cadeia principal de polipeptídeo na área da substituição, por exemplo, na forma de folha ou em conformação helicoidal; (b) da carga ou hidrofobicidade da molécula no sítio desejado; ou (c) do volume da cadeia lateral. Os aminoácidos podem ser agrupados de acordo com similaridades nas propriedades de suas cadeias laterais (em *A. L. Lehninger, in Biochemistry*, segunda ed., pp. 73-75, *Worth Publishers*, Nova Iorque (1975)):

(1) Apolares: Ala (A), Val (V), Leu (L), Ile (I), Pro (P), Phe (F), Trp (W), Met (M)

(2) Sem carga polar: Gly (G), Ser (S), Thr (T), Cys (C), Tyr (Y), Asn (N), Gln (Q)

(3) Ácido: Asp (D), Glu (E)

(4) Básico: Lys (K), Arg (R), His(H)

Alternativamente, os resíduos de ocorrência natural podem ser divididos em grupos com base nas propriedades comuns da cadeia lateral:

(1) Hidrofílicos: Norleucina, Met, Ala, Val, Leu, Ile;

(2) Hidrofílicos neutros: Cys, Ser, Thr, Asn, Gln;

(3) Ácido: Asp, Glu;

(4) Básico: His, Lys, Arg;

(5) Resíduos que influenciam na orientação das cadeias: Gly, Pro;

(6) Aromático: Trp, Tyr, Phe.

Substituições não-conservadoras causarão a substituição de um membro de uma dessas classes por outra classe. Tais resíduos substituídos também podem ser introduzidos nos locais conservados da substituição ou, mais preferivelmente, nos locais (não-conservados) restantes.

Um tipo particularmente preferido de variante de substituição

envolve a substituição de um ou mais resíduos da região hipervariável de um anticorpo parental (por exemplo, anticorpo humano e humanizado). Geralmente, a(s) variante(s) resultante(s) selecionada(s) para desenvolvimento adicional terá(ão) propriedades biológicas modificadas (por exemplo, aprimoradas) com relação ao anticorpo parental do qual é(são) gerado(s). Resumidamente, diversos sítios de regiões hipervariáveis (por exemplo, 6 a 7 sítios) sofrem mutações para gerar todas as substituições amino possíveis em cada sítio. Os anticorpos assim gerados são exibidos a partir de partículas de fagos filamentosos fundidos ao gene produto do gene III de M13 com cada partícula. As variantes exibidas por fago são, então, selecionadas de acordo com a sua atividade biológica (por exemplo, afinidade de ligação) conforme descrita na presente invenção. A fim de identificar possíveis sítios de regiões hipervariáveis para modificação, mutagênese por varredura de alanina pode ser realizada para identificar resíduos de regiões hipervariáveis que contribuem significativamente para a ligação de antígenos. Alternativamente ou adicionalmente, pode ser benéfico analisar a estrutura cristalina do complexo antígeno-anticorpo para identificar pontos de contato entre o anticorpo e o antígeno. Tais resíduos de contato e resíduos vizinhos são candidatos à substituição de acordo com as técnicas realizadas no presente. Após a geração de tais variantes, o quadro de variantes é submetido à seleção conforme descrito na presente invenção e os anticorpos com propriedades superiores em um ou mais testes relevantes podem ser selecionados para desenvolvimento adicional.

Moléculas de ácidos nucléicos que codificam variantes da seqüência de aminoácidos do anticorpo são preparadas por meio de uma série de métodos conhecidos no estado da técnica. Estes métodos incluem, mas não se limitam a, o isolamento a partir de uma fonte natural (no caso de variantes de seqüências de aminoácidos de ocorrência natural) ou preparação por meio de mutagênese mediada por oligonucleotídeo (ou sítio-dirigida), mutagênese

por PCR e cassete de mutagênese de uma variante preparada anteriormente ou uma versão não-variante do anticorpo.

Pode ser desejável introduzir uma ou mais modificações de aminoácidos em uma região Fc do anticorpo da invenção, gerando assim uma região Fc variante. A região Fc variante humana pode compreender uma seqüência região Fc (por exemplo, região Fc da IgG1, IgG2, IgG3 ou IgG4 seqüência) que inclui uma modificação de aminoácido (por exemplo, uma substituição) em um ou mais posições de aminoácidos incluindo o de uma dobradiça de cisteína.

De acordo com esta descrição e os ensinamentos no estado da técnica, é contemplado que, em alguns exemplos, um anticorpo da invenção pode constar de uma ou mais alterações em comparação com o anticorpo homólogo do tipo selvagem, por exemplo, na região Fc. Estes anticorpos, porém, mantém sensivelmente as mesmas características exigidas para a utilidade terapêutica, comparativamente ao seu homólogo do tipo selvagem. Por exemplo, podem ser feitas algumas alterações na região Fc, que alteraram (isto é, ou melhoram ou diminuem) a ligação ao C1q e/ou a citotoxicidade dependente do complemento (CDC), por exemplo, como descrito no documento WO99/51642. Vide também Duncan e Winter, *Nature* 322:738-40 (1988); Patente US 5.648.260; Patente US. 5.624.821, e documento WO94/29351 relativas a outros exemplos de região Fc variantes.

IMUNOCONJUGADOS

A presente invenção também se refere à imunoconjugados ou a anticorpos conjugados com drogas (CAD), compreendendo um anticorpo conjugado a um agente citotóxico tal como um agente quimioterápico, droga, agente inibidor de crescimento, toxina (por exemplo, uma toxina enzimaticamente ativa de origem bacteriana, fúngica, vegetal ou animal, ou fragmentos destes) ou um isótopo radioativo (isto é, um radioconjugado).

O uso anticorpos conjugados com drogas para a entrega local de agentes citotóxicos ou citostático, isto é, drogas para matar ou inibir células tumorais no tratamento do câncer (Syrigos and Epenetos (1999) *Anticancer Research* 19:605-614; Niculescu-Duvaz e Springer (1997) *Adv. Drg Del. Rev.* 26:151-172; Patente US 4.975.278) teoricamente permitem a entrega da droga a célula alvo de parte do tumor, e o acúmulo intracelular deste, onde a administração sistêmica destes agentes não conjugados com drogas pode resultar em níveis inaceitáveis de toxicídade em células normais bem como em células do tumor que precisam ser eliminadas (Baldwin *et al.*, (1986) *Lancet* pp. (15 de Março de 1986):603-05; Thorpe, (1985) "*Antibody Carriers Of Cytotoxic Agents In Cancer Therapy*: Uma revisão em,"*Monoclonal Antibodies '84: Biological And Clinical Applications*, A. Pinchera *et* al. (ed.s), pp. 475-506). Procura-se desse modo a eficácia máxima com toxicidade mínima. Tanto os anticorpos policlonais quanto os anticorpos monoclonais foram relatados como úteis nestas estratégias (Rowland *et al.*, (1986) *Cancer Immunol. Immunother.*, 21:183-87). As drogas usadas nestes métodos incluem a daunomicina, doxorubicina, metotrexate, e a vindesina (Rowland *et al.*, (1986) *Supra*). As toxinas usadas em conjugados anticorpo-toxina incluem as toxinas bacterianas tais como a toxina da difteria, toxina de plantas tais como a ricina, pequenas moléculas de toxinas tais como a geldanamicina Mandler *et al* (2000) *Jour. of the Nat. Cancer Inst.* 92(19):1573-1581; Mandler *et al* (2000) *Bioorganic & Med. Chem. Letters* 10:1025-1028; Mandler *et al* (2002) *Bioconjugate Chem.* 13:786-791), maitansinóides (Patente EP 1391213; Liu *et al.*, (1996) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93:8618-8623), e caliceamicina (Lode *et al* (1998) *Cancer Res.* 58:2928; Hinman *et al* (1993) *Cancer Res.* 53:3336-3342). As toxinas podem realizar seus efeitos citotóxicos e citostáticos por mecanismos incluindo a ligação da tubulina, a ligação do DNA ou a inibição da topoisomerase. Algumas drogas citotóxicas tendem a ser inativas ou mais menos ativas quando

conjugadas com anticorpos ou ligantes de proteínas receptoras.

ZEVALIN® (ibritumomab tiuxetan, Biogen/Idec) é um conjugado anticorpo-radioisótopo composto de um anticorpo monoclonal IgG1 kappa murino dirigido contra ao antígeno CD20 encontrado na superfície de linfócitos normais e malignos e ligado ao radioisótopo In^{111} ou Y^{90} ligado por um quelante ligante a uma tiourea (Wiseman *et al* (2000) *Eur. Jour. Nucl. Med.* 27(7):766-77; Wiseman *et al* (2002) *Blood* 99(12):4336-42; Witzig *et al* (2002) *J. Clin. Oncol.* 20(10):2453-63; Witzig *et al* (2002) *J. Clin. Oncol.* 20(15):3262-69). Embora ZEVALIN tenha a atividade contra o linfoma de célula B não Hodgkin (NHL), a administração resulta em citopenias graves e prolongadas na a maioria dos pacientes. MYLOTARG™ (gemtuzumab ozogamicina, *Wyeth Pharmaceuticals*), um anticorpo conjugado a droga composto de um anticorpo hu CD33 ligado a caliceamicina, foi aprovado em 2000 para o tratamento da leucemia mielóide aguda por injeção (*Drugs of the Future* (2000) 25(7):686; Patente US 4970198; US 5079233; US 5585089; US 5606040; US *5693762*; US 5739116; US 5767285; US 5773001). Cantuzumab mertansina (*Immunogen, Inc.*), um conjugado anticorpo-droga composto pelo anticorpo huC242 ligado através do ligante SPP a fração maitansinóide da droga, DM1 do bissulfeto, está avançando em experimentações de fase II para o tratamento dos cânceres que expressam CanAg como, por exemplo, pancreático, gástrico entre outros. MLN-2704 (*Millennium Pharm.*, BZL *Biologics, Immunogen Inc.*), um conjugado anticorpo-droga composto pelo anticorpo monoclonal específico para antígeno de membrana anti-prostático (PSMA) ligado a fração maitansinóide da droga, DM1, está sob o desenvolvimento para o tratamento potencial de tumores de próstata. Os peptídeos da auristatina, auristatina E (AE) e a monometilauristatina (MMAE), análogos sintéticos da dolastatina, conjugado aos anticorpos monoclonais quimérico cBR96 (específico para o carcinoma de Lewis Y) e cAC10 (específico para o CD30 em malignidades hematológicas)

(Doronina *et al* (2003) Nature Biotechnology 21(7):778-784) e estão sob desenvolvimento terapêutico.

Os agentes quimioterápicos úteis na geração de tais imunoconjugados são descritos acima no presente. Toxinas enzimaticamente ativas e seus fragmentos que podem ser utilizados incluem cadeia A de difteria, fragmentos ativos não-ligantes da toxina de difteria, cadeia A de exotoxina (de *Pseudomonas aeruginosa*), cadeia A rícina, cadeia A de abrina, cadeia A de modecina, alfa-sarcina, proteínas de Aleurites fordii, proteínas de diantina, proteínas de *Phytolaca americana* (PAPI, PAPII e PAP-S), inibidor *Momordica charantia*, curcina, crotina, inibidor de *Sapaonaria officinalis*, gelonina, mitogelina, restrictocina, fenomicina, enomicina e os tricotecenos. Uma variedade de radionucleotídeos está disponível para a produção de anticorpos radioconjugados. Exemplos incluem Bi^{212}, I^{131}, In^{131}, Y^{90} e Re^{186}. Os conjugados do antagonista e agente citotóxico podem ser fabricados utilizando uma série de agentes acopladores de proteínas bifuncionais, tais como propionato de N-succinimidil-3-(2-piridilditiol) (SPDP), iminotiolano (IT), derivados bifuncionais de imidoésteres (tais como adipimidato de dimetila HCl), ésteres ativos (tais como suberato de dissuccinimidila), aldeídos (tais como glutaraldeído), compostos bis-azido (tais como bis-(para-azidobenzoil)-hexanodiamina), derivados bis-diazônio (tais como bis-(para-diazoniobenzoil)-etilenodiamina), diisocianatos (tais como 2,6-diisocianato de tolueno) e compostos de flúor bis-ativo (tais como 1,5-difluoro-2,4-dinitrobenzeno). Pode-se preparar, por exemplo, uma imunotoxina rícina, conforme descrito em Vitetta *et al., Science* 238: 1098 (1987). Ácido 1-isotiocianatobenzil-3-metildietileno triaminopentaacético marcado por carbono 14 (MX-DTPA) é um exemplo de agente quelante para conjugação de radionucleotídeo ao antagonista. Vide o documento WO 94/11026.

Conjugados de um antagonista e uma ou mais toxinas de

moléculas pequenas, tais como caliqueamicina, maitansinóides, tricoteno e CC1065 e seus derivados que também apresentam atividades de toxinas, são contemplados no presente.

MAITANSINA E MAITANSINÓIDES

Em alguns exemplos de realizações, o imunoconjugado compreende o anticorpo da invenção conjugado a uma ou mais moléculas maitansinóides.

Maitansinóides são inibidores mitóticos que agem através da inibição da polimerização de tubulina. Maitansina foi isolada pela primeira vez a partir de *Maytenus serrata* (patente US 3.896.111). Descobriu-se em seguida que determinados micróbios também produzem maitansinóides, tais como maitansinol e ésteres C-3 de maitansinol (patente US 4.151.042). Maitansinol sintético, seus derivados e análogos são descritos, por exemplo, nas patentes US 4.137.230, US 4.248.870, US 4.256.746, US 4.260.608, US 4.265.814, US 4.294.757, US 4.307.016, US 4.308.268, US 4.308.269, US 4.309.428, US 4.313.946, US 4.315.929, US 4.317.821, US 4.322.348, US 4.331.598, US 4.361.650, US 4.364.866, US 4.424.219, US 4.450.254, US 4.362.663 e US 4.371.533, as divulgações dos quais são expressamente incorporada ao presente pela referência.

CONJUGADOS ANTICORPO-MAITANSINÓIDE

Em uma tentativa de melhorar seu índice terapêutico, maitansina e maitansinóides têm sido conjugados com anticorpos que se ligam especificamente a antígenos de células tumorais, imunoconjugados contendo maitansinóides e sua utilização terapêutica são divulgados, por exemplo, na Patente US 5.208.020, US 5.416.064 e Patente Européia EP 0 425 235 Bl, as divulgações dos quais são expressamente incorporada ao presente pela referência. Liu *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 93:8618-8623 (1996) descreveu imunoconjugados compreendendo um maitansinóide designado

DM1 ligado ao anticorpo monoclonal dirigido contra C242 humano de câncer colorretal. O conjugado demonstrou-se sendo altamente citotóxico para células de câncer de cólon cultivadas, e mostrou uma atividade anti-tumoral em uma análise do crescimento tumoral *in vivo*. Chari *et al.*, *Cancer Research* 52:127-131 (1992) descrevem imunoconjugados em que um maitansinóide foi conjugado através de uma ligação de dissulfeto ao anticorpo murino A7 ligante para um antígeno em linhagem de células de câncer de cólon humano, ou outro anticorpo monoclonal murino TA.I que se liga ao oncogene *WSR.-2/neu*. A citotoxicidade do conjugado TA.I-maitansinóide foi testada *in vitro* sobre a linhagem de células de câncer de mama humano SK-BR-3, que expressa 3 x 10^5 antígenos de superfície HER-2 por célula. A droga conjugada atinge um grau de citotoxicidade semelhante à droga maitansinóide livre, o que poderia ser aumentado pelo aumento no número de moléculas de maitansinóides por molécula de anticorpo. O conjugado A7-maitansinóide apresentaram baixa citotoxicidade sistêmica em camundongos.

CONJUGADOS ANTICORPO-MAITANSINÓIDE (IMUNOCONJUGADOS)

Os conjugados anticorpo-maitansinóide são preparados quimicamente ligando um anticorpo a uma molécula de maitansinóide sem diminuir significativamente a atividade biológica do anticorpo ou da molécula maitansinóide. Uma média de 3-4 moléculas maitansinóide conjugada por a molécula de anticorpo mostrou eficácia em amplificar a citotoxicidade em células alvo sem afetar negativamente a função ou a solubilidade do anticorpo, embora mesmo uma molécula de anticorpo/toxina se esperasse amplificar a citotoxicidade sobre o uso de um anticorpo nú. Maitansinóide são bem conhecidos no estado da técnica e podem ser sintetizados por técnicas conhecidas ou isolados de fontes naturais. Maitansinóide apropriados são descritos, por exemplo, na patente US 5.208.020 e outras atentes e publicações não patentes referidas abaixo no presente. Os maitansinóides

preferidos são maitansinol e análogos do maitansinol modificados no anel aromático ou em outras posições da molécula do maitansinol, tais como vários ésteres do maitansinol.

Existem diversos grupos de ligação conhecidos no estado da técnica para a fabricação de conjugados de anticorpo e maitansinóide, que incluem, por exemplo, os descritos na patente US 5.208.020 ou Patente EP 0.425.235 B1 e Chari *et al.*, *Cancer Research* 52: 127-131 (1992). Os grupos de ligação incluem grupos dissulfeto, grupos tioéter, grupos de ácidos lábeis, grupos fotolábeis, grupos lábeis de peptidase ou grupos lábeis de esterase, conforme descrito nas patentes identificadas acima.

Os conjugados do anticorpo e maitansinóide podem ser fabricados através da utilização de uma série de agentes acopladores protéicos bifuncionais, tais com propionato de N-succinimidil-3-(2-piridilditio) (SPDP), cicloexano-1-carboxilato de succinimidil-4-(N-maleimidometila), iminotiolano (IT), derivados bifuncionais de imidoésteres (tais como adipimidato de dimetila HCl), ésteres ativos (tais como suberato de disuccinimidila), aldeídos (tais como glutaraldeído), compostos bis-azido (tais como bis-(para-azidobenzoil)-hexanodiamina), derivados de bis-diazônio (tais como bis-(para-diazoniobenzoil)-etilenodiamina), diisocianatos (tais como 2,6-diisocianato de tolueno) e compostos de flúor bis-ativo (tais como 1,5-difluoro-2,4-dinitrobenzeno). Em certos exemplos de realização, os agentes acopladores incluem propionato de N-succinimidil-3-(2-piridiltio) (SPDP) (Carlsson *et al.*, *Biochem. J.* 173: 723-737 (1978)) e pentanoato de N-succinimidil-4-(2-piridiltio) (SPP) para proporcionar a ligação de dissulfeto.

O ligante pode estar unido à molécula de maitansinóide em diversas posições, dependendo do tipo da ligação. Uma ligação éster pode ser formada, por exemplo, através da reação com um grupo hidroxila, utilizando-se técnicas convencionais de acoplamento. A reação pode ocorrer na posição C-3

que possui um grupo hidroxila, na posição C-14 modificada com hidroximetila, na posição C-15 modificada com um grupo hidroxila e na posição C-20 que possui um grupo hidroxila. Em uma realização preferida, a ligação é formada na posição C-3 do maitansinol ou um análogo do maitansinol.

CALIQUEAMICINA

Outro imunoconjugado de interesse compreende um anticorpo conjugado a uma ou mais moléculas de caliqueamicina. A família caliqueamicina de antibióticos é capaz de produzir quebras de DNA de fita dupla em concentrações sub-picomolares. Para a preparação de conjugados da família de caliqueamicina, vide as patentes US 5.712.374, US 5.714.586, US 5.739.116, US 5.767.285, US 5.770.701, US 5.770.710, US 5.773.001 e US 5.877.296 (todas da American Cyanamid Company). Análogos estruturais de caliqueamicina que podem ser utilizados incluem, mas sem limitar-se a, γ_1^I, α_2^I, α_3^I, N-acetil-γ_1^I, PSAG e $2'_1$ (Hinman et al., *Cancer Research* 53: 3336-3342 (1993), Lode et al., *Cancer Research* 58: 2925-2928 (1998) e as patentes US da American Cyanamid citadas acima). Outra droga antitumoral à qual o anticorpo pode ser conjugado é QFA, que é um antifolato. Tanto caliqueamicina quanto QFA contêm sítios intracelulares de ação e não atravessam facilmente a membrana plasmática. Portanto, a absorção celular desses agentes através de internalização mediada por anticorpos aumenta grandemente seus efeitos citotóxicos

OUTROS AGENTES CITOTÓXICOS

Outros agentes anti-tumor que podem ser conjugados aos anticorpos da invenção incluem BCNU, streptozoicina, vincristina e 5-fluorouracil, a família do complexo LL-E33288 de agentes conhecidos coletivamente descrito nas patentes US 5.053.394 e US 5.770.710, bem como as esperamicinas (Patente US 5.877.296).

Toxinas enzimaticamente ativas e seus fragmentos que podem ser utilizados incluem cadeia A de difteria, fragmentos ativos não-ligantes da

toxina de difteria, cadeia A de exotoxina (de *Pseudomonas aeruginosa*), cadeia A rícina, cadeia A de abrina, cadeia A de *modeccina*, alfa-sarcina, proteínas de *Aleurites fordii*, proteínas de diantina, proteínas de *Phytolaca americana* (PAPI, PAPII e PAP-S), inibidor *Momordica charantia*, curcina, crotina, inibidor de *Sapaonaria officinalis*, gelonina, mitogelina, restrictocina, fenomicina, enomicina e os tricotecenos. Vide, por exemplo, o documento WO 93/21232, publicado em 28 de outubro de 1993.

A presente invenção contempla adicionalmente um antagonista conjugado a um composto com atividade nucleolítica (por exemplo, ribonuclease ou uma endonuclease de DNA, tal como deoxirribonuclease; DNase).

Para a destruição seletiva do tumor, o anticorpo pode conter um átomo altamente radioativo. Uma série de isótopos radioativos é disponível para a produção de antagonistas radioconjugados. Exemplos incluem At^{211}, I^{131}, I^{125}, Y^{90}, Re^{186}, Re^{188}, Sm^{153}, Bi^{212}, P^{32}, Pb^{212} e isótopos radioativos de Lu. Quando o conjugado for utilizado para diagnóstico, ele pode compreender um átomo radioativo para estudos cintilográficos, por exemplo, tc^{99m} ou 1^{123}, ou uma marca de *spin* para formação de imagem através de ressonância magnética nuclear (NMR) (também conhecida como formação de imagem por ressonância magnética, MRI), tal como novamente o iodo-123, iodo-131, índio-111, flúor-19, carbono-13, nitrogênio-15, oxigênio-17, gadolínio, manganês ou ferro.

A radiomarcação ou outras podem ser incorporadas ao conjugado de formas conhecidas. O peptídeo pode ser, por exemplo, biossintetizado ou pode ser sintetizado através de síntese química de aminoácidos, utilizando precursores de aminoácidos apropriados, envolvendo, por exemplo, flúor-19 no lugar de hidrogênio. Marcas tais como tc^{99m}, I^{123}, Re^{186}, Re^{188} e In^{111} podem ser ligadas através de um resíduo de cisteína no peptídeo. Ítrio-90 pode ser ligado através de um resíduo de lisina. O método Iodogen (Fraker *et al.* (1978), *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 80: 49-57) pode ser utilizado para a

incorporação de iodo-123. *Monoclonal Antibodies in Immunoscintigraphy* (Chatal, CRC Press, 1989) descreve outros métodos em detalhes.

Os conjugados do anticorpo e agente citotóxico podem ser fabricados por meio de uma série de agentes acopladores protéicos bifuncionais, tais como propionato de N-succinimidila-3-(2-piridilditio) (SPDP), cicloexano-1-carboxilato de succinimidil-4-(N-maleimidometila), iminotiolano (IT), derivados bifuncionais de imidoésteres (tais como adipimidato de dimetila HCl), ésteres ativos (tais como suberato de di-succinimidila), aldeídos (tais como glutaraldeído), compostos bis-azido (tais como bis-(*para*-azidobenzoil)-hexanodiamina), derivados bis-diazônio (tais como bis-(*para*-diazoniobenzoil)-etilenodiamina), diisocianatos (tais como 2,6-diisocianato de tolueno) e compostos de flúor bis-ativo (tais como 1,5-difluoro-2,4-dinitrobenzeno). Pode-se preparar, por exemplo, uma imunotoxina rícina, conforme descrito em Vitetta et al., *Science* 238: 1098 (1987). Ácido 1-isotiocianatobenzil-3-metildietileno triaminopentaacético marcado por carbono 14 (MX-DTPA) é um exemplo de agente quelante para conjugação de radionucletídeo ao anticorpo. Vide o documento WO 94/11026. O ligante pode ser um "ligante capaz de ser clivado" que facilita a liberação da droga citotóxica na célula. Pode-se utilizar, por exemplo, um ligante de ácido lábil, ligante sensível à peptidase, ligante fotolábel, ligante de dimetila ou ligante contendo dissulfeto (Chari *et al.*, *Cancer Research* 52: 127-131 (1992); patente US 5.208.020).

Os compostos da invenção contemplam expressamente, mas não são limitados a, ADC preparado com reagentes reticulantes: BMPS, EMCS, GMBS, HBVS, LC-SMCC, MBS, MPBH, SBAP, SIA, SIAB, SMCC, SMPB, SMPH, sulfo-EMCS, sulfo-GMBS, sulfo-KMUS, sulfo-MBS, sulfo-SIAB, sulfo-SMCC, sulfo-SMPB, e SVSB (succinimidil-(4-vinilsulfona)benzoato) que estão comercialmente disponíveis (por exemplo, pela Pierce Biotechnology, Inc., Rockford, IL., EUA). Veja páginas 467-498 de *Applications Handbook and*

Catalog 2003-2004.

PREPARAÇÃO DE ANTICORPOS CONJUGADOS COM DROGAS

Nos conjugados de anticorpos com drogas (ADC) da invenção, um anticorpo conjugado (Ab) a um ou mais frações da droga (D), por exemplo, cerca de 1 a 20 frações da droga por anticorpo, através de um ligante (L). O ADC da fórmula I pode ser preparado por diversos protocolos, empregando reações de química orgânica, circunstancias e reagentes conhecidos por aqueles hábeis na técnica, incluindo: (1) reação de um grupo nucleofílico de um anticorpo com um reagente ligante bivalente, para formar Ab-L, através de uma ligação covalente, seguida pela reação com a fração de droga D; e (2) reação de um grupo nucleofílico de uma fração da droga com um reagente ligante bivalente, para formar D-L, através de uma ligação covalente, seguida pela reação com o grupo nucleofílico de um anticorpo.

$$\mathbf{Ab\text{-}(L\text{-}D)_p}$$

Os grupos nucleofílico nos anticorpos incluem, mas não são limitados: (i) grupos amino N-terminal, (ii) grupos amino da cadeia lateral, por exemplo lisina, (iii) grupos tiol da cadeia lateral, por exemplo cisteína, e (iv) hidroxila do açúcar ou grupos amino onde o anticorpo é glicosilado. Os grupos amino, tiol e hidroxila são nucleofílicos e capazes de reagir às ligações de forma covalente com os grupos eletrofílicos em frações dos ligantes e reagentes ligantes incluindo: (i) ésteres ativos tais como ésteres de NHS, ésteres de HOBt, haloformatos, e halides ácidos; (ii) Alquilas e halides benzil tais como haloacetamidas; (iii) grupos dos aldeídos, das cetonas, carboxil e maleimida. Determinados anticorpos têm ligações intercadeias reduzidas, isto é, pontes de cisteína. Os anticorpos podem ser feitos reativos pela conjugação com os reagentes ligantes pelo tratamento com um agente redutor, tal como DTT (ditiotreitol). Cada ponte do cisteína dará forma assim, teoricamente, a dois tióis nucleofílicos reativos. Os grupos nucleofílicos adicionais podem ser

introduzidos em anticorpos pela reação das lisinas com 2-iminotiolano (reagente de Traut) tendo por resultado a conversão de uma amina em um tiol.

Os conjugados de anticorpos com drogas da invenção podem também ser produzidos pela modificação do anticorpo para introduzir a região eletrofílicas, que podem reagir com os substituintes nucleofílicos no reagente ligante ou na droga. Os açúcares de anticorpos glicosilados podem ser oxidados, por exemplo, com os reagentes de oxidação periodato, para dar forma ao aldeído ou aos grupos cetona que podem reagir com o grupo amino dos ligantes reagentes ou frações das drogas. Os grupos iminas resultantes de Schiff do podem dar forma a uma ligação estável, ou podem ser reduzidos, por exemplo pelo reagente borohidrido para formar ligações amino estáveis. Em uma incorporação, a reação da porção do hidrato de carbono de um anticorpo glicosilado com a galactose oxidase ou o metaperiodato de sódio pode formar grupos carbonil (aldeído e cetona) na proteína que desta forma pode reagir com os grupos apropriados na droga (Hermanson, *Bioconjugate Techniques*). Em outra incorporação, as proteínas que contêm a serina N-terminal ou os resíduos do treonina podem reagir com o meta-periodato de sódio, tendo por resultado a produção de um aldeído no lugar do primeiro aminoácido (Geoghegan & Stroh, (1992) *Bioconjugate Chem.* 3:138-146; US 5362852). Tal aldeído pode reagir com um ligante reagente ou uma fração da droga nucleofílica.

Do mesmo modo, os grupos nucleofílicos em uma fração da droga incluem, mas não são limitados a: grupos amino, tiol, hidroxila, hidrazida, oxime, hidrazina, tiosemicarbazona, carboxilato de hidrazina e grupos arilhidrazida capazes de reagir na forma de ligações covalente com os grupos eletrofílicos em frações do ligante e reagente do ligante incluindo: (i) ésteres ativos, tais como, ésteres de NHS, ésteres de HOBt, haloformates e halides ácidos; (ii) Alquilas e halides benzil tais como haloacetamidas;; (iii) grupos dos

aldeídos, das cetonas, carboxil e maleimida.

Alternativamente, pode ser feito uma proteína de fusão compreendendo o anticorpo e o agente citotóxico, por exemplo, por técnicas recombinantes ou pela síntese de peptídeo. O comprimento do DNA pode compreender as regiões respectivas que codificam as duas porções do conjugado estão adjacentes ou separadas por uma região que codifica um peptídeo ligante que não destrua as propriedades desejadas do conjugado.

Contudo em outro exemplo de realização, o anticorpo pode ser conjugado a um "receptor" (como, por exemplo, a estreptoavidina) para a utilização no tumor pré direcionando o conjugado anticorpo-receptor que é administrado ao paciente, seguido pela remoção do conjugado que não se ligou ao receptor e está na circulação, pelo uso de um agente de limpeza, e então é feita a administração de um "ligante" (por exemplo, avidina) no qual, está conjugado a um agente citotóxico (por exemplo, um radionucleotídeo).

ANTICORPOS DERIVATIVOS

Os anticorpos da invenção podem ainda ser modificados para conter moléculas adicionais não-proteinácias que são conhecidos na técnica e prontamente disponíveis. Em um exemplo de realização, as moléculas adequadas para derivatização do anticorpo são polímeros hidrossolúveis. Exemplos não limitantes de polímeros hidrossolúveis incluem, mas não se limitando a, polietilenoglicol (PEG), copolímeros de etileno-glicol/propilenoglicol, carboximetilcelulose, dextrano, álcool polivinílico, policloreto pirrolidona, poli-1, 3-dioxolano, poli-1,3,6-trioxano, copolímero etileno/maleica anidrido, poliaminoácidos (homopolímeros ou copolímeros aleatórios), e dextrano ou poli (n-vinil pirrolidona) polietileno-glicol, homopolímeros de propropileno glicol, co-polímeros de óxido de polipropileno óxido de etileno, poliálcool polióis (por exemplo, glicerol), álcool polivinílico, e suas misturas. O polietilenoglicol propionaldeído pode ter vantagens no processo de fabricação devido à sua

estabilidade na água. O polímero pode ser de qualquer peso molecular, e pode ser ramificada ou sem ramificação. O número de polímeros acoplados por anticorpo pode variar, e se mais de um polímero encontra-se anexo, os polímeros podem ser a mesma molécula ou moléculas diferentes. Em geral, o número e/ou tipo de polímeros utilizado para derivatização pode ser determinado com base em considerações, incluindo mas não limitado-se a, propriedades específicas ou funções do anticorpo de ser melhorado, se os anticorpos derivados serão utilizados no âmbito de uma terapia, etc.

FORMULAÇÕES FARMACÊUTICAS

Formulações terapêuticas compreendendo o anticorpo da invenção são preparadas são preparadas para o armazenamento através da mistura de um anticorpo que tenha o grau desejado de pureza com veículos, excipientes ou estabilizantes farmaceuticamente aceitáveis opcionais (*Remington's Pharmaceutical Sciences*, 16ª edição, Osol, A. Ed. (1980)), na forma de formulações liofilizadas, soluções aquosas ou outras formulações secas. Veículos, excipientes ou estabilizantes aceitáveis são atóxicos para pacientes nas dosagens e concentrações empregadas e incluem tampões tais como fosfato, citrato, histidina e outros ácidos orgânicos, antioxidantes que incluem ácido ascórbico e metionina; conservantes (tais como cloreto de octadecildimetilbenzilamônio, cloreto de hexametônio, cloreto de benzalcônio, cloreto de benzetônio; álcool fenólico, butílico ou benzílico; alquilparabenos tais como metil ou propilparabeno; catecol; resorcinol; cicloexanol; 3-pentanol e meta-cresol); polipeptídeos de baixo peso molecular (menos de cerca de 10 resíduos); proteínas, tais como albumina de soro, gelatina ou imunoglobulinas; polímeros hidrofílicos, tais como polivinilpirrolidona; aminoácidos, tais como glicina, glutamina, asparagina, histidina, arginina ou lisina; monossacarídeos, dissacarídeos e outros carboidratos, incluindo glicose, manose ou dextrinas; agentes quelantes tais como EDTA; açúcares, tais como sacarose, manitol,

trealose ou sorbitol; contra-íons formadores de sais tais como sódio; complexos metálicos (por exemplo, complexos protéicos de Zn); e/ou tensoativos não-iônicos, tais como TWEEN™, PLURONICS™ ou polietilenoglicol (PEG).

A formulação da presente invenção pode também conter mais de um composto ativo, conforme necessário para a indicação específica sendo tratada, preferencialmente, ditos compostos apresentam atividades complementares que não prejudica um ao outro. Tais moléculas são apresentadas de forma apropriada em combinação em quantidade que são eficazes para o propósito pretendido.

Os ingredientes ativos podem também ser armazenados em microcápsulas preparadas, por exemplo, através de técnicas conservação ou polimerização interfacial, tais como microcápsulas de hidroximetilcelulose ou microcápsulas de gelatina e de poli-(metacrilato de metila), respectivamente, em sistemas de fornecimento de drogas coloidais (por exemplo, lipossomos, microesferas de albumina, microemulsões, nanopartículas e nanocápsulas), ou em macroemulsões. Ditas técnicas são descritas em *Remington's Pharmaceutical Sciences*, 16ª edição, Ed. Osol, A. (1980).

As formulações a serem utilizadas para administração *in vivo* devem ser estéreis. Por exemplo, pela filtração através das membranas de filtração estéreis.

Podem ser fabricadas preparações de liberação prolongada. Exemplos apropriados de preparações de liberação prolongada incluem matrizes semipermeáveis de polímeros hidrofóbicos sólidos que contenham a imunoglobulina da invenção, que se encontram na forma de artigos moldados, tais como filmes ou microcápsulas. Exemplos de matrizes de liberação prolongada incluem poliésteres, hidrogéis (tais como poli-(metacrilato de 2-hidroxietila) ou álcool poli-(vinílico)), poli-lactídeos (patente US 3.773.919), copolímeros de ácido L-glutâmico e L-glutamato de g etila, acetato de

etilenovinila não-degradável, copolímeros degradáveis de ácido láctico e ácido glicólico, tal como LUPRON DEPOT™ (microesferas injetáveis compostas de copolímero de ácido láctico e ácido glicólico e acetato de leuprolide) e ácido poli-D-(-)-3-hidroxibutírico. Embora polímeros tais como etilenovinilacetato e ácido láctico-ácido glicólico permitam a liberação de moléculas por mais de 100 dias, certos hidrogéis liberam proteínas por períodos de tempo mais curtos. Quando anticorpos encapsulados permanecem no organismo por um longo período de tempo, eles podem desnaturas ou agregar como resultado da exposição à umidade a 37°C, resultando em uma perda da atividade biológica e possíveis mudanças na imunogenicidade. Estratégias racionais podem ser planejadas para estabilização, dependendo do mecanismo envolvido. Por exemplo, se o mecanismo de agregação for descoberto para ser a formação de ligação S-S intermolécula através intercadeia tio-sulfeto, a estabilização pode ser alcançada por resíduos sulfidrila, liofilização de soluções ácidas, controle do teor da umidade, utilizando aditivos apropriados, e desenvolvimento de composições matrizes de polímero específicas.

Uso

Um anticorpo da invenção pode ser utilizado, por exemplo,em *in vitro*, *ex vivo* e em métodos terapêuticos *in vivo*. Os anticorpos da invenção podem ser usados como um antagonista para bloquear parcial ou totalmente a atividade específica do antígeno *in vitro*, *ex vivo* e/ou *in vivo*. Além disso, pelo menos alguns dos anticorpos da invenção podem neutralizar a atividade do antígeno de outras espécies. Assim, os anticorpos da invenção podem ser usados para inibir a atividade de um antígeno específico, por exemplo, em uma cultura celular contendo os antígenos, em seres humanos ou em outros mamíferos, em indivíduos que tenham o antígeno com o qual um anticorpo da invenção reage cruzadamente (por exemplo, chimpanzé, babuíno, mico, cinomolgo e Rhesus, porco ou camundongo). Em um exemplo de realização, o

anticorpo da invenção pode ser usado para inibir a atividade do antígeno expondo o anticorpo com o antígeno de tal maneira que a atividade do antígeno é inibida. Em um exemplo de realização, o antígeno é uma molécula de proteína humana.

Em um exemplo de realização, um anticorpo da invenção pode ser usado em um método para inibir um antígeno em um paciente que sofre de uma doença na qual a atividade do antígeno é prejudicial, compreendendo em administrar ao paciente um anticorpo da invenção na qual a atividade do antígeno do paciente é inibida. Em um exemplo de realização, o antígeno é uma molécula de proteína humana e o paciente é um paciente humano. Alternativamente, o paciente pode ser um mamífero que expressa o antígeno com o qual o anticorpo da invenção se liga. Adicionalmente, o paciente pode ser um mamífero no qual foi introduzido o antígeno (por exemplo, a administração do antígeno ou a expressão de um antígeno transgênico). O anticorpo da invenção pode ser administrado a um paciente humano para fins terapêuticos. Além disso, o anticorpo da invenção pode ser administrado a um mamífero não-humano que expressa o antígeno com o qual o anticorpo se liga por reação cruzada (por exemplo, um primata, porco ou rato) para fins veterinários ou como um modelo animal de doenças humanas. Com relação a este último citado, esses modelos animais podem ser úteis para avaliar a eficácia terapêutica dos anticorpos da invenção (por exemplo, testes de dosagens e curso de tempo da administração).

Os anticorpos antagonistas ou capazes de bloquear da invenção que são úteis incluem, por exemplo, mas sem se limitar a, anticorpos anti-HER-2. O anticorpo anti-HER2 da invenção pode, por exemplo, ser usado para tratar, inibir, atrasar a progressão, prevenir/atrasar a reincidência, atenuar ou prevenir doenças, afecções ou condições associadas à expressão anormal e/ou atividade de uma ou mais moléculas de antígenos, incluindo mas não se

limitando a tumores malignos e benignos; malignidades linfóides e não leucêmicas; distúrbios neuronais, gliais, astrocitais, do hipotálamo e outros distúrbios glandulares, macrofágicos, epiteliais, estromais e blastocélicos; e distúrbios inflamatórios e imuno relacionados.

Em um aspecto, anticorpos de bloqueio da invenção são específicos para um antígeno ligante, e inibem a atividade do antígeno, bloqueando ou interferindo com a interação ligante-receptor envolvendo o antígeno ligante, inibindo assim a via de sinalização celular e molecular correspondente ou outros eventos. A invenção também tem a vantagem de possuir receptores de anticorpos específicos que não necessariamente impedem a ligação do ligante, mas interferem com a ativação do receptor, inibindo assim a quaisquer respostas que, normalmente, seria iniciada pela ligação do ligante. Em certos exemplos de realização, a invenção também engloba anticorpos que preferencialmente ou exclusivamente se ligam ao complexo ligante-receptor. Um anticorpo da invenção também pode atuar como um agonista de um antígeno receptor específico, assim, potencializando, reforçando ou ativando parcial ou totalmente, as atividades do ligante mediado pela ativação do receptor.

Distúrbios ou condições e testes diagnósticos associados com HER-2 são descritos na Patente US 6.387.371, que é incorporada ao presente pela referência. Vide também o documento W098/17797. A administração a um paciente de uma quantidade terapeuticamente eficaz de anticorpos anti-receptor HER-2 inibe o crescimento de células tumorais e é útil no tratamento do câncer. Trastuzumab (Genentech, Inc.) é um anticorpo monoclonal humanizado recombinante dirigido contra o domínio extracelular de HER-2 para o tratamento de cânceres que superexpressam HER-2 / possui o gene HER-2 amplificado, sobretudo no câncer de mama metastático (MBC). Esses anticorpos são úteis no tratamento de outros cânceres especialmente aqueles que expressam

HER-2. O anticorpo também pode ser administrado a pacientes em associação com outros terapêuticos, como por exemplo, paclitaxel ou Tarceva®.

Em alguns exemplos de realização, um anticorpo anti-DR5 induz a apoptose em células cancerosas. Em alguns exemplos de realização, o anticorpo anti-DR5 é um agonista de DR5. Em outros exemplos de realização, o anticorpo compete com o DR5 pela ligação ao Apo-2L.

Assim como referido anteriormente, anticorpos DR5 da invenção têm várias utilidades. Por exemplo, anticorpos DR5 agonísticos podem ser empregados em métodos para tratar patologias em mamíferos como câncer ou doenças relacionadas com a imunidade. Condições imuno-relacionadas incluem artrite reumatóide, lúpus eritematoso sistêmico, esclerodermia, idiopática miopatias inflamatórias, síndrome de sjögren, vasculite sistêmica, sarcoidose, anemia hemolítica autoimune, tireoidite, doença renal imuno relacionada, tal como, glomerulonefrite, doença desmielinizante, como a esclerose múltipla, doença autoimune da pele, tal como psoríase, doenças e infiltrados pulmonares inflamatórias, e doenças alérgicas como a asma.

O diagnóstico das várias condições patológicas em mamíferos descritas no presente pode ser realizado pelo médico qualificado. Técnicas de diagnóstico estão disponíveis no estado da técnica as quais permitem, por exemplo, o diagnóstico ou detecção de câncer ou doenças relacionadas com a imunidade em um mamífero. Por exemplo, cânceres podem ser identificados através de técnicas, incluindo mas não limitado a, palpação, análise do sangue, raio-X, NMR, e similares. Doenças imune-relacionadas podem também ser facilmente identificadas. Por exemplo, no lúpus eritematoso sistêmico, o mediador central da doença é a produção de auto-anticorpos reativos a proteínas/tecidos do próprio paciente e a subseqüente geração da inflamação imuno-mediada. Múltiplos órgãos e sistemas são afetados clinicamente incluindo rim, pulmão, sistema musculoesquelético, mucocutâneo, olhos,

sistema nervoso central, sistema cardiovascular, trato gastrintestinal, medula óssea e sangue. Os médicos estão familiarizados com uma série de doenças no qual a intervenção da resposta imune e/ou inflamatória têm se beneficiado.

Em um exemplo de realização especifico um imunoconjugado que compreende um anticorpo com um agente citotóxico é administrado ao paciente. Em alguns exemplos de realização, o imunoconjugado e/ou o antígeno ao qual este está ligado é internalizado pela célula, resultando em aumento da eficácia terapêutica do imunoconjugado na morte de células a qual se liga. Em uma realização preferida, o agente citotóxico se combina ou interfere com o ácido nucléico em células cancerosas. Exemplos de ditos agentes citotóxicos incluindo agentes quimioterápicos citados no presente (por exemplo, matasinóides ou caliquiamicinas), isótpos radioativos ou ribonucleases e endonucleases de DNA.

Os anticorpos da invenção podem ser utilizados isoladamente ou em combinação com outras composições em uma terapia. Por exemplo, um anticorpo da invenção pode ser co-administrado com outro anticorpo, agente(s) quimioterápico(s) (incluindo coquetéis de agentes quimioterápicos), outro agente(s) citotóxico(s)m, agente(s) anti-angiogênico(s), citocinas ou agente(s) inibidor(es) do crescimento. No qual o anticorpo da invenção inibe o crescimento de um tumor, e este pode ser, se desejado, combinado com outro agente terapêutico adicional que tmbém inibe o crescimento do tumor. Por exemplo, um anticorpo da invenção pode ser combinado com um anticorpo anti-VEGF (por exemplo, AVASTIN) e/ou anticorpos anti-ErbB (por exemplo, anticorpos anti-HER-2, HERCEPTIN®), em um esquema de tratamento, por exemplo, no tratamento de uma das doenças descritas no presente, incluindo câncer colorretal, câncer de mama metastático e câncer de rim. Alternativamente, ou adicionalmente, o paciente pode receber radioterapia combinada (por exemplo, feixe irradiação externa ou terapia com um agente

radioativo marcado, tal como um anticorpo). Essas terapias combinadas referidas acima incluem a administração combinada (no qual dois ou mais agentes estão incluídas na mesma, ou em formulações distintas), e administração separada, e nesse caso, a administração do anticorpo da invenção pode ocorrer antes, e/ou após a administração da terapia ou terapias adjuvantes.

O anticorpo da invenção (e agente terapêutico adjunto) é/são administrado(s) por qualquer meio apropriado, que inclui parenteral, subcutâneo, intraperitoneal, intrapulmonar e intranasal e, se desejado para tratamento local, administração intralesional. As infusões parenterais incluem administração intramuscular, intravenosa, intraarterial, intraperitoneal ou subcutânea. Além disso, o antagonista é administrado adequadamente por meio de infusão no pulso, particularmente com doses decrescentes do antagonista. Preferencialmente, a dosagem é fornecida por meio de injeções, de maior preferência injeções intravenosas ou subcutâneas, dependendo, em parte de se a administração é rápida ou crônica.

A composição de anticorpo deve ser formulada, dosada e administrada de uma forma consistente com as boas práticas médicas. Fatores para consideração neste contexto incluem a disfunção particular a ser tratado, o mamífero particular a ser tratado, a condição clínica do paciente, a causa da disfunção, o local de fornecimento do agente, o método de administração, o esquema de administração e outros fatores conhecidos pelos médicos. O anticorpo não precisa ser, mas é opcionalmente formulado com um ou mais agente normalmente utilizado para prevenir ou tratar a disfunção em questão. A quantidade eficaz destes outros agentes depende da quantidade do anticorpo presente na formulação, do tipo de disfunção ou tratamento, e outros fatores discutidos acima. Estes são geralmente utilizados nas mesmas dosagens e com vias de administração conforme descritas acima ou cerca de 1 a 99% das dosagens descritas no presente.

Para a prevenção ou tratamento de doença, a dosagem apropriada de anticorpo (quando utilizado isoladamente ou em combinação com outros agentes tais como agentes quimioterápicos) dependerá do tipo de doença a ser tratada, do tipo de anticorpo, da severidade e do curso da doença, se o anticorpo é administrado para propósitos preventivos ou terapêuticos, terapia anterior, histórico clínico do paciente, reação ao anticorpo e do critério do médico atendente. O anticorpo é adequadamente administrado ao paciente em uma vez ou ao longo de uma série de tratamentos. Dependendo do tipo e da severidade da doença, cerca de 1 µg/kg a 15 mg/kg (tal como 0,1mg/kg a 10 mg/kg) de anticorpo é uma possível dose inicial para administração ao paciente, seja, por exemplo, por meio de uma ou mais administrações separadas ou por meio de infusão contínua. Uma dosagem diária típica poderá variar de cerca de 1 µg/kg a 100 mg/kg ou mais, dependendo dos fatores mencionados acima. Para administrações repetidas ao longo de vários dias ou mais, dependendo da condição, o tratamento é mantido até que ocorra supressão desejada de sintomas da doença. Uma dosagem exemplar do anticorpo estará na faixa de cerca de 0,05 mg/kg a 10 mg/kg. Desta forma, uma ou mais doses de cerca de 0,5 mg/kg, 2,0 mg/kg, 4,0 mg/kg ou 10 mg/kg (ou qualquer de suas combinações) podem ser administradas ao paciente. Essas doses podem ser administradas intermitentemente, tal como semanalmente ou a cada três semanas (por exemplo, de tal forma que o paciente receba cerca de duas a cerca de vinte, tal como cerca de seis doses do anticorpo). Dose de ataque inicial mais alta, seguida por uma ou mais doses mais baixas, pode ser administrada. Exemplo de regime de dosagem compreende a administração de dose de carregamento inicial de cerca de 4 mg/kg, seguida por dose de manutenção semanal de cerca de 2 mg/kg do anticorpo. Entretanto, outros regimes de dosagens podem ser úteis. O andamento desta terapia é facilmente monitorado por meio de técnicas e testes

convencionais.

ARTIGOS MANUFATURADOS

Em outro aspecto da invenção, um artigo manufaturado, contendo os materiais úteis para o tratamento, prevenção e/ou diagnóstico das desordens acima descritas são fornecidos. O artigo manufaturado consta de um recipiente e rótulo ou uma bula sobre ou associado ao recipiente. Os recipientes apropriados incluem, por exemplo, frascos, seringas, *blisters*, etc. Os recipientes podem ser feitos de uma variedade de materiais tais como o vidro ou o plástico. O recipiente guarda uma composição a qual está sozinha ou está combinada com outra composição eficaz para tratar prevenir e/ou diagnosticar a condição e que possa ter uma porta de acesso estéril (por exemplo, o recipiente pode ser um bolsa de solução intravenosa ou um frasco que possui um controlador (*stopper pierceable*) colocado através de uma agulha de injeção hipodérmica). Pelo menos um agente ativo na composição é um anticorpo da invenção. O rótulo ou a bula indicam que a composição é útil para o tratamento de escolha. Adicionalmente, o artigo manufaturado pode compreender (a) um primeiro recipiente com uma composição nele contida, onde a composição compreende um anticorpo da invenção, e (b) um segundo recipiente com uma composição nele contida que compreende um agente citotóxico ou outro agente terapêutico. O artigo manufaturado nesta realização da invenção pode ainda compreender um folheto informativo que indique que as composições podem ser usadas para tratar um caso especial. Alternativamente, ou adicionalmente, o artigo manufaturado pode ainda compreende de um segundo (ou terceiro) recipiente contendo um tampão farmaceuticamente aceitável, como água bacteriostática para injeção (BWFI), solução salina tamponada com fosfato, solução de Ringer e solução de dextrose. Pode-se incluir ainda outros materiais desejáveis a partir de uma perspectiva comercial e de uso, que inclui outros tampões, diluentes, filtros,

agulhas e seringas.

Após a invenção ter sido descrita de forma geral, a mesma será mais facilmente compreendido pela referência aos exemplos seguintes, que são fornecidas com objetivo de ilustrar e não são destinados a limitar a invenção.

EXEMPLOS

EXEMPLO1

CONSTRUÇÃO DE BIBLIOTECAS DE FAB EXIBIDAS POR FAGO COM RESÍDUOS DE CDR ENRIQUECIDO EM TYR, SER, GLY E ARG

Bibliotecas de Fab exibidas por fago foram construídas utilizando um vetor fagomídeo, Fab-C, que resultou na exibição de moléculas Fab bivalente dimerizadas por uma cisteína livre inserida entre o Fab da cadeia pesada e o domínio C-terminal do gene-3 da proteína secundária da cápside (P3C). Este vetor foi construído como descrito no pedido de Patente US 2005/0119455 e em Lee *et al.*, *J. Immunol. Meth.*. 284: 1 19-132 (2004). O vetor (ilustrado esquematicamente na figura 5) inclui os domínios variáveis do anticorpo 4D5 humanizado sob o controle do promotor *Ptac* IPTG-indutível. Anticorpo 4D5 humanizado tem essencialmente a seqüência consenso humano da região estrutural das cadeias leves e pesadas, e regiões CDR de um anticorpo monoclonal de camundongo específico para HER-2. Métodos para a produção de anticorpos anti-HER-2 e a identidade das seqüências do domínio variável são fornecidos nas Patentes US 5.821.337 e US 6.054.297.

Quatro bibliotecas foram construídas: YSGR-A, YSGR-B, YSGR-C, e YSGR-D. As bibliotecas foram construídas com resíduos aleatorizados em todas as três CDRs de cadeias pesadas e leves CDR3. Cada biblioteca foi aleatorizada nas posições 91-94 e 96 de CDRL3, 28 e 30-33 de CDRH1, 50, 52-54, 56 e 58 de CDRH2, e nas posições 95, 96, 97, 98, 99, 100, 100a, 100b

e 100c de CDRH3. O tipo e relação dos aminoácidos permitida a cada uma das posições aleatorizadas estão ilustrados na Figura 8. Além disso, o comprimento do CDRH3 foi variado, utilizando oligonucleotídeos que substituíram os sete códons do tipo selvagem nas posições de 95 a 100a com seis a dezessete códons. Assim, em certos casos, o códon correspondente a posição 100a da cadeia pesada não estava presente (por exemplo, quando a mutagênese foi realizada com os oligonucleotídeos mutagênicos H3-A6 (SEQ ID No: 35), H3-B6 (SEQ ID No: 47), H3-C6 (SEQ ID No: 59) ou H3-D6 (SEQ ID No: 71), como descrito abaixo. Vide Figura 9A-D O tipo e a relação de aminoácidos permitidas nessas posições eram as mesmas que as descritas na Figura 8 para as posições 95-100a da CDRH3.

Bibliotecas foram construídas utilizando o método de Kunkel (Kunkel, TA, Roberts, JD & Zakour, RA, *Methods Enzymol.* (1987), 154, 367-382), com métodos anteriormente descritos (Sidhu, SS, Lowman, HB, Cunningham, BC & Wells, JA, *Methods Enzymol.* (2000), 328, 333-363). Uma versão única "molde de parada" do vetor de exibição do Fab, Fab-C foi utilizada para gerar todas as quatro bibliotecas, como descrito no Exemplo 1.

Oligonucleotídeos mutagênicos com códons de degenerescência nas posições a serem diversificadas, foram utilizados para simultaneamente (a) introduzir diversidades em CDR e (b) reparar dos códons de parada. As seqüências destes oligonucleotídeos mutagênicos são exibidas nas Figuras 9A-9D. Para todas as bibliotecas, diversidade foi introduzida no CDR-H1, CDR-H2 e CDR-H3 com oligonucleotídeos H1, H2 e L3, respectivamente (SEQ ID Nos:). Para a biblioteca YSGR-A, foi introduzida uma diversidade de CDR-H3 com uma mistura equimolar de oligonucleotídeos H3-A6, H3-A7, H3-A8, H3-A9, H3-A10, H3-A11, H3-A12, H3-A13, H3-A14, H3-A15, H3-A16, e H3-A17 (SEQ ID Nos: 35-46). Para a

biblioteca YSGR-B, foi introduzida uma diversidade de CDR-H3 com uma mistura equimolar de oligonucleotídeos H3-B6, H3-B7, H3-B8, H3-B9, H3-B10, H3-B11, H3-B12, H3- ' B13, H3-B14, H3-B15, H3-B16, e H3-B17 (SEQ ID Nos: 47-58). Para a biblioteca YSGR-C, foi introduzida uma diversidade de CDR-H3 com uma mistura equimolar de oligonucleotídeos H3-C6, H3-C7, H3-C8, H3-C9, H3-C10, H3-C11, H3-C12, H3-C13, H3-C14, H3-C15, H3-C16, e H3-C17 (SEQ ID Nos: 59-70). Para a biblioteca YSGR-D, foi introduzida uma diversidade de CDR-H3 com uma mistura equimolar de oligonucleotídeos H3-D6, H3-D7, H3-D8, H3-D9, H3-D10, H3-D11, H3-D12, H3-D13, H3-D14, H3-D15, H3-D16, e H3-D17 (SEQ ID Nos: 71-82). Cada um dos oligonucleotídeos mutagênicos H3-A6 para H3-A17 (SEQ ID Nos: 35-46), H3-B6 a H3-B17 (SEQ ID Nos: 47-58), H3-C6 a H3-C17 (SEQ ID Nos: 59-70) e H3-D6 a H3-D17 (SEQ ID Nos: 71 -82) codificado uma alanina na posição 93 da cadeia pesada. Os oligonucleotídeos mutagênicos para todos os CDRs foram aleatorizados para ser incorporado simultaneamente em uma única reação de mutagênese, assim a incorporação simultânea de todos os oligonucleotídeos mutagênicos resultou na introdução da diversidade projetada em cada posição e, reparando simultaneamente todos os códons de parada TAA. Assim, um quadro de leitura aberto foi gerado para codificar uma biblioteca Fab fundida a uma ponte de cisteína homodimerizante e P3C. Seguindo a mutagênese, as quatro bibliotecas foram combinadas para criar uma única biblioteca, denominada biblioteca YSGR-AD.

As reações de mutagênese foram eletroporadas em *E. coli SS320* (Sidhu *et al.*, *Supra*). As células transformadas foram cultivadas overnight na presença de auxiliador de fago M13-K07 (New England Biolabs, Beverly, MA) para produzir partículas de fago que encapsulam o DNA de fagomídeos e exibem fragmentos de Fab em suas superfícies. A biblioteca combinada

contém mais que 3 x 10^{10} membros únicos.

EXEMPLO2

SELEÇÃO DE ANTICORPOS ESPECÍFICOS A PARTIR DE BIBLIOTECAS YSGR-AD *NAIVES*

Fago da biblioteca YSGR-AD (descrito no Exemplo 1, acima) foram ciclizados através de etapas de seleção por ligação para enriquecer clones ligantes de DR5 ou HER-2 humanos. As seleções foram realizadas utilizando métodos de ligação descritos anteriormente (Sidhu *et al.*, *Supra*).

Uma seqüência do DR5 é exibida na Tabela 1. Um domínio extracelular do DR5 como demonstrado na Tabela 1 é utilizado na seleção por ligação. De modo semelhante, uma seqüência do domínio extracelular do HER-2 humano é preparada como descrito por Franklin MC. Carey KD. Vajdos FF. Leahy DJ. de Vos AM. Sliwkowski MX, *Insights into ErbB signaling from the structure of the ErbB2-pertuzumab complex, Cancer Cell.* 5(4):317-28, 2004. A seqüência para HER-2 ECD (aminoácidos 23-646) é fornecida no *Protein DataBank Record* 1S78 (2004).

Placas NUNC de 96 poços *Maxisorp Immunoplates* foram revestidas *overnight* a 4 °C, com 5 µg/mL de proteína alvo (DR5 humano ou HER-2 humano) e bloqueadas por 2 horas com uma solução de PBT (tampão fosfato contendo adicionalmente 0,2% BSA e 0,05% de *Tween 20* (Sigma)). Após o crescimento *overnight* a 37 °C, os fagos foram concentrados por precipitação com PEG/NaCl e foram ressuspendidos em PBT, como descrito anteriormente (Sidhu *et al.*, *Supra*). A solução de Fago (cerca de 10^{12} fago/mL) foram adicionados à placa *Immunoplate* revestida. Após duas horas de incubação para permitir a ligação do fago, as placas foram lavadas dez vezes com PBT. Os fago ligados foram eluídos com 0,1 M de HCl por dez minutos e os eluentes foram neutralizados com 1,0 M de base Tris. Os fagos eluídos foram amplificados em *E. coli XL-1-blue* e utilizadas para novas etapas de seleção.

As bibliotecas foram submetidas a cinco etapas de seleção contra cada proteína alvo. Clones individuais de cada etapa de seleção foram cultivados em palcas de 96 poços em 500 µL de caldo de 2YT complementado com carbenicilina e M13-K07. O sobrenadante da cultura foi utilizada diretamente em fago ELISA (Sidhu *et al.*, *Supra*) para detectar Fabs exibidos por fago que se ligaram nas placas revestidas com a proteína alvo, mas não se ligaram as placas revestidas com BSA. Ligantes específicos foram definidos como aqueles clones de fago que exibiram um sinal de ELISA de, no mínimo, 10 vezes maior nas placas revestidas com a proteína alvo, em comparação com placas revestidas com BSA. Clones individuais foram selecionados depois de 4 e 5 eta pas de seleção para se ligarem ao DR5 humano ou HER-2 humano. Os ligantes específicos foram submetidos à análise das seqüências. Os ligantes específicos foram também analisados utilizando um ensaio de afinidade ELISA *spot*, especificidade por ELISA, e afinidade para HER-2 utilizando métodos como os descritos no presente. (Vide, Figura 11.) Tal como indicado na Figura 10, as bibliotecas YSGR-AD produzem ligantes específicos contra ambas as proteínas alvo.

Dos 240 clones identificados que se ligam especificamente ao HER-2 humano, 106 delas tiveram seqüências de CDR únicas (Vide, Figura 11). As seqüências únicas caíram em 3 categorias: 1) 6-7 resíduo nas seqüências CDRH3; 2) oito resíduo nas seqüências CDRH3; e 3) CDR de comprimento médio nas seqüências com tirosina, serina e glicina na seqüência.

O domínio variável de cadeia pesada do anti-HER-2 demonstrou uma preferência por seqüências CDRH3 curtas (por exemplo, 6-7 aminoácidos na posições correspondentes a 95 a 100a) não incluídas na biblioteca de oligo. (Vide, Figura 12). O CDRH3 exibe um resíduo tirosina conservada na extremidade N-terminal na posição 95. A outra posição conservada é encontrada na posição 99, que é predominantemente glicina. As seqüências

consensos são exibidas para CDRL3: QQSYYX4PST (SEQ ID No: 587); CDRH1-.GFSIX2X3SYIH (SEQ ID No: 588); e CDRH2: SIYPX3SGYTSYADSKVG (SEQ ID No: 589), no qual X representa uma posição de aminoácido para a qual um resíduo consenso não foi identificado e onde a posição X em cada CDR é Y ou S.

Os domínios variáveis de cadeia pesada que possuem CDRH3 com oito aminoácidos tem conservado glicinas nos finais do N e C-terminais do CDRH3 (nas posições 95 e 100a). A posição 98 é também conservada com uma tirosina. A posição 99 com um CDHR3 de 8 aminoácidos demonstra uma preferência por um pequeno aminioácido tal como G, S, A, ou T. Essa posição é seguida por um grande aminoácido na posição 100, tal como R, H, Y, e W. Sequências consenso são mostradas por CDRH1:GFX1ISYSSIH (SEQ ID No 590); e CDRH2:SIYPX3YGX5TX6YADSKVG (SEQ ID No 591), onde X representa uma posição de aminoácido para a qual um resíduo consenso não foi identificado e é Y ou S.

Análise do domínio variável da cadeia pesada de comprimento médio (por exemplo, cerca de 12 a 14 aminoácidos) da região CDRH3 fornece uma seqüência consenso CDRH3; XEX2X3X4YYSYYX10GX12X13X14DY (SEQ ID No:592), no qual X representa uma posição de aminoácido para a qual um resíduo consenso não foi identificado e onde a posição X1 é selecionado de Y, S e R, X2 é selecionado de Y e S; X3 é selecionado de G, Y e S; X4 é selecionado de G, Y e S; X4 é selecionado de Y, S, R e G; X10 é selecionado de Y, S e G, X12 é selecionado de Y, S e G; X13 é selecionado de G e A e X14 é selecionado de I, F, M e L (vide, Figura 14). Como o CDRH3 forma uma alça, o consenso para o CDRH3 foi desenvolvido pela transferência da seqüência para alguns clones de mais de dois aminoácidos, de modo que a posição 95 da seqüência poderia se alinhar com a posição 97 da seqüência de referência que, neste caso, foi a seqüência do clone 52 . A seqüência de consenso

também é demonstrada para CDRH1: GFX1ISSSS1H (SEQ ID No :593); e CDRH2: X1IX2PSSGYTX6YADSKVG (SEQ ID No:594), no qual X representa uma posição de aminoácido para a qual um resíduo consenso não foi identificado e é Y ou S.

Tal como descrito na Figura 11B, vários dos clones ligados a HER-2 tiveram IC_{50} entre 0,1 a I0 nM. Na maior parte, estes ligantes de alta afinidade tinham pouca ou nenhuma reação cruzada com outros antígenos, tais como VEGF, DR5, insulina, neutravidina, hormônio do crescimento humano ou IGF-1.

Tal como indicado na Figura 10, 144 clones que expressavam Fabs foram identificados por serem ligantes específicos para o DR5 humano. A seqüência de análise identificou 18 seqüências únicas de aminoácidos desses 144 clones, exibidos na Figura 15.

O IC_{50} de cada um destes ligantes foram determinados por competição em fago ELISA, seguido pela incubação em poços 96-NUNC *Maxisorp Immunoplates* revestido *overnight* a 4 °C com hDR5-ECD (5 µg/ml) e bloqueado com BSA. Fabs exibidos por Fagos foram multiplicados em *E. coli XLI-blue*, com a adição de auxiliador de fago M13-K07. Após o crescimento *overnight* a 37 °C em meio 2YT, os fagos foram concentrados por precipitação em PEG/NaCl e ressuspendidos em tampão fosfato-salino tamponado (PBS), 0,5% (w/v) de BSA, 0,1% (v/v) de *Tween 20* (tampão PBT). Os Fagos foram diluídos seriadamente em tampão PBT e a ligação foi mensurada para determinar a concentração de fago dando um sinal de saturação de ~ 50%. Uma concentração sub saturada fixada de fago foi pré-incubada por 2h em diluições seriadas hDR5-ECD e, depois, transferidas para efetuar a análise das placas revestidas com hDR5-ECD. Após 15 min de incubação, as placas foram lavadas com PBS, 0,05% de *Tween 20* e incubadas por 30 min com conjugado peroxidase de rábano silvestre /anticorpo anti-M13 (diluição 1:5000 em tampão PBT). As placas foram lavadas, desenvolvidas com substrato TMB, e apagadas

com 1,0 M de H_3PO_4, e lido espectrofotometricamente a 450 nm. A afinidade de ligação dos ligantes anti-hDR5

A afinidade de ligação dos ligantes anti-hDR5 foram determinadas como valores IC_{50} definido como a concentração de hDR5-ECD que bloqueou 50% da ligação do fago para o hDR5-ECD imobilizado.

Os clones foram analisados pela ligação ao domínio extracelular do DR5 humano (SEQ ID No: 595). Os ligantes com o menor IC_{50} têm predominantemente srina no CDRH1 e arginina no CDRH3 nas posições 96 e 99. Análise do domínio variável da cadeia pesada da região CDRH3 fornece uma seqüência consenso de CDRH3: YRX3YRYGX8X9X10GSYX14X15DY (SEQ ID No:596), no qual X3 é selecionado a partir de Y, S, R, P e G; X8 é selecionado a partir de R, Y e S; X9 é selecionado a partir de G, Y e S; X10 é selecionado a partir de S, Y e R; X14 é selecionado a partir de G e A e X15 é selecionado a partir de L e F, no qual X representa uma posição de aminoácido para a qual um resíduo consenso não foi identificado. (vide, Figura 16). A seqüência de consenso também é demonstrada para CDRL3: QQXIX2X3SPST (SEQ ID No: 597), no qual X1, X2 e X3 são Y ou S; CDRH2: X1ISPX3X4GYTX6YADSKVG (SEQ ID No:599), no qual X representa uma posição de aminoácido para a qual um resíduo consenso não foi identificado e é X ou Y. As seqüências consenso podem ser utilizadas, nomeadamente, para a constituição de novas bibliotecas de domínios variáveis de anticorpos. No CDRH3, os aminoácidos nas posições 97, 100b, 100c, 100h e 100i podem contribuir para a maior afinidade.

Os clones também foram analisados pela ligação ao DR5 murino utilizando o teste fago ELISA por competição descrita acima. Vários clones foram isolados a partir da biblioteca YSGR-A-D que se ligava tanto a DR5 humano quanto a DR5 murino, embora a ligação a DR5 murino ter sido de afinidade muito menor. (vide Figura 17). Esta biblioteca fornecida para o

isolamento de anticorpos que possam se ligar tanto a DR5 humano quanto a DR5 murino indicando que os ligantes foram identificados como únicos, comparado a um total de CDRH3 aleatório (todos os vinte aminoácidos) e a uma biblioteca YS CDRH3. Modificando a diversidade de aminoácidos permitidos em cada posição, pode fornecer anticorpos que se ligam a diferentes epítopos e que possuem funções biológicas únicas. Anticorpo anti-DR5 que se ligam tanto a CDRs humanos quanto a CDRs murinos podem se ligar a epítopos diferentes do que aqueles anticorpos anti-DR5 das bibliotecas anteriormente desenvolvidas.

EXEMPLO3

ANÁLISE DOS LIGANTES DE DR5

O sítio de ligação para ligante de Apo 2L para o DR5 humano foi previamente mapeado e a estrutura cristalina para o sítio de ligação foi determinada (vide, Hymowitz *et al*, *Molecular Cell* 4:564 (1999); e documento WO01/19861). A estrutura cristalina e modelos podem ser usados para mapear a ligação dos anticorpos anti-DR5.

Estudos anteriores identificaram anticorpos que se ligam a DR5 humano. Esses anticorpos são designados BDF1 e YSD1. O anticorpo BDF1 foi isolado de uma biblioteca em que os CDRs foram aleatorizados em todos os 20 aminoácidos e possuindo as seqüências CDR: 1) seqüência CDRH1 de IGKSGIH (SEQ ID No: 600); 2); seqüência CDR2 da VAVIYPHDGNTAYA (SEQ ID No: 601); e 3) seqüência CDRH3 de RLALVRMWMD (SEQ ID No: 602). O anticorpo YSD1 foi isolado de uma biblioteca na qual as posições CDR foram variadas com tirosina e de serina e possui uma seqüência CDRH3 de YSSYYSYYYSSSSYSY (SEQ ID No: 603), O sítio de ligação destes anticorpos ao DR5 humano está localizado no N terminal da molécula e tem pouca sobreposição com o ligante de Apo 2L, que predominantemente se encontra no C terminal (aminoácidos da alça 50s, por exemplo, aminoácidos, 50-65 e

aminoácidos da alça 90s, por exemplo, aminoácidos 91 a 104 do DR5). Um modelo demonstrando a ligação das regiões CDRH3 de cada um desses anticorpos é mostrado na Figura 18. O CDRH3 do BDF1 e YSD1 se sobrepõe e forma um local preferencial (*hot spot*) de ligação para o DR5. A ligação do CDRH3 do YSD1 é mediada por tirosinas e a ligação do BFD1 é mediada pela seqüência LAL. A ligação do YSD 1 no DR5 envolve a leucina, glutamina, alanina, fenilalanina, arginina e resíduos da DR5.

EXEMPLO 4

CONSTRUÇÃO DE BIBLIOTECAS DE FAB EXIBIDAS POR FAGO COM RESÍDUOS DE CDRH1, H2 E L3 ENRIQUECIDO EM SER E ALA, CYS, ESP, GLY, ILE, LEU, ASN, PRO, ARG, THR, TRP OU TYR

Bibliotecas de Fab exibidas por fago foram construídas utilizando um vetor fagomídeo, Fab-C, que resultou na exibição de moléculas Fab bivalente dimerizadas por uma cisteína livre inserida entre o Fab da cadeia pesada e o domínio C-terminal do gene-3 da proteína secundária da cápside (P3C), como descrito previamente noExemplo 1.

Doze bibliotecas foram construídas: SAH3, SCH3, SFH3, SGH3, SLH3, SNH3, SPH3, SRH3, STH3, SWH3, e SYH3. As bibliotecas foram construídas com resíduos aleatorizados em todas as três CDRs de cadeias pesadas e leves CDR3. Cada biblioteca foi aleatorizada nas posições: 91-94 e 96 de CDRL3, posições 28 e 30-33 da CDRH1, posições50, 52-54, 56 e 58 da CDRH2 e posições 95-100, 100a a 100m da CDRH3. O tipo e relação dos aminoácidos permitida a cada uma das posições aleatorizadas estão ilustrados nas Figuras 19A-19B. Além disso, o comprimento do CDRH3 foi variado, utilizando oligonucleotídeos que substituíram os seis códons do tipo selvagem entre as posições 95 e 100 com 4 a 10 códons. O tipo e a relação de aminoácidos permitidas nessas posições eram as mesmas que as descritas nas Figuras 19A-19B para as posições 95-100 da CDRH3.

Bibliotecas foram construídas utilizando o método de Kunkel (Kunkel, *et. al., Methods Enzymol.* (1987), 154, 367-382), com métodos anteriormente descritos (Sidhu, SS, *et al, Methods Enzymol.* (2000), 328, 333-363). Uma versão única "molde de parada" do vetor de exibição do Fab, Fab-C foi utilizada para gerar todas as quatro bibliotecas, como descrito no Exemplo 1.

Oligonucleotídeos mutagênicos com códons de degenerescência nas posições a serem diversificadas, foram utilizados para simultaneamente (a) introduzir diversidades em CDR e (b) reparar dos códons de parada. As seqüências destes oligonucleotídeos mutagênicos são exibidas nas Figuras 20A-20L. Para todas as bibliotecas, diversidade foi introduzida no CDR-H1, CDR-H2 e CDR-H3 com oligonucleotídeos H1, H2 e L3, respectivamente (SEQ ID Nos:).

Para a biblioteca SAH3, foi introduzida uma diversidade de CDR-H3 com uma mistura equimolar de oligonucleotídeos H3-SA4, H3-SA5, H3-SA6, H3-SA7, H3-SA8, H3-SA9, H3-SA10, H3-SA11, H3-SA12, H3-SA13, H3-SA14, H3-SA15, H3-SA16, e H3-SA17 (SEQ ID Nos: 621-634).

Para a biblioteca SCH3, foi introduzida uma diversidade de CDRH3 com uma mistura equimolar de oligonucleotídeos H3-SC4, H3-SC5, H3-SC6, H3-SC7, H3-SC8, H3-SC9, H3-SC10, H3-SC11, H3-SC12, H3-SC13, H3-SC14, H3-SC15, H3-SC16, e H3-SC17 (SEQ ID Nos: 635-648).

Para a biblioteca SFH3, foi introduzida uma diversidade de CDR-H3 com uma mistura equimolar de oligonucleotídeos H3-SF4, H3-SF5, H3-SF6, H3-SF7, H3-SF8, H3-SF9, H3-SF10, H3-SF11, H3-SF12, H3-SF13, H3-SF14, H3-SF15, H3-SF16, e H3-SF17 (SEQ ID Nos: 649-662).

Para a biblioteca SGH3, foi introduzida uma diversidade de CDR-H3 com uma mistura equimolar de oligonucleotídeos H3-SG4, H3-SG5, H3-SG6, H3-SG7, H3-SG8, H3-SG9, H3-SG10, H3-SG11, H3-SG12, H3-SG13, H3-SG14, H3-SG15, H3-SG16, e H3-SG17 (SEQ ID Nos: 663-676).

Para a biblioteca SIH3, foi introduzida uma diversidade de CDR-H3 com uma mistura equimolar de oligonucleotídeos H3-SI4, H3-SI5, H3-SI6, H3-SI7, H3-SI8, H3-SI9, H3-SI10, H3-SI11, H3-SI12, H3-SI13, H3-SI14, H3-SI15, H3-SI16, e H3-SI17 (SEQ ID Nos: 677-690).

Para a biblioteca SLH3, foi introduzida uma diversidade de CDR-H3 com uma mistura equimolar de oligonucleotídeos H3-SL4, H3-SL5, H3-SL6, H3-SL7, H3-SL8, H3-SL9, H3-SL10, H3-SL11, H3-SL12, H3-SL13, H3-SL14, H3-SL15, H3-SL16, e H3-SL17 (SEQ ID Nos: 691-704).

Para a biblioteca SNH3, foi introduzida uma diversidade de CDR-H3 com uma mistura equimolar de oligonucleotídeos H3-SN4, H3-SN5, H3-SN6, H3-SN7, H3-SN8, H3-SN9, H3-SN10, H3-SN11, H3-SN12, H3-SN13, H3-SN14, H3-SN15, H3-SN16, e H3-SN17 (SEQ ID Nos: 705-718).

Para a biblioteca SPH3, foi introduzida uma diversidade de CDR-H3 com uma mistura equimolar de oligonucleotídeos H3-SP4, H3-SP5, H3-SP6, H3-SP7, H3-SP8, H3-SP9, H3-SP10, H3-SP11, H3-SP12, H3-SP13, H3-SP14, H3-SP15, H3-SP16, e H3-SP17 (SEQ ID Nos: 719-732).

Para a biblioteca SRH3, foi introduzida uma diversidade de CDR-H3 com uma mistura equimolar de oligonucleotídeos H3-SR4, H3-SR5, H3-SR6, H3-SR7, H3-SR8, H3-SR9, H3-SR10, H3-SR11, H3-SR12, H3-SR13, H3-SR14, H3-SR15, H3-SR16, e H3-SR17 (SEQ ID Nos: 733-746).

Para a biblioteca STH3, foi introduzida uma diversidade de CDR-H3 com uma mistura equimolar de oligonucleotídeos H3-ST4, H3-ST5, H3-ST6, H3-ST7, H3-ST8, H3-ST9, H3-ST10, H3-ST11, H3-ST12, H3-ST13, H3-ST14, H3-ST15, H3-ST16, e H3-ST17 (SEQ ID Nos: 747-760).

Para a biblioteca SWH3, foi introduzida uma diversidade de CDR-H3 com uma mistura equimolar de oligonucleotídeos H3-SW4, H3-SW5, H3-SW6, H3-SW7, H3-SW8, H3-SW9, H3-SW10, H3-SW11, H3-SW12, H3-SW13, H3-SW14, H3-SW15, H3-SW16, e H3-SW17 (SEQ ID Nos: 761-774).

Para a biblioteca SYH3, foi introduzida uma diversidade de CDR-H3 com uma mistura equimolar de oligonucleotídeos H3-SY4, H3-SY5, H3-SY6, H3-SY7, H3-SY8, H3-SY9, H3-SY10, H3-SY11, H3-SY12, H3-SY13, H3-SY14, H3-SY15, H3-SY16, e H3-SY17 (SEQ ID Nos: 775-788).

Os oligonucleotídeos mutagênicos para todos os CDRs foram aleatorizados para ser incorporado simultaneamente em uma única reação de mutagênese, assim a incorporação simultânea de todos os oligonucleotídeos mutagênicos resultou na introdução da diversidade projetada em cada posição e, reparando simultaneamente todos os códons de parada TAA. Assim, um quadro de leitura aberto foi gerado para codificar uma biblioteca Fab fundida a uma ponte de cisteína homodimerizante e P3C. Seguindo mutagênese, as vinte bibliotecas foram combinadas para criar uma única biblioteca, denominada biblioteca SXH3.

As reações de mutagênese foram eletroporadas em *E. coli SS320* (Sidhu *et al.*, *Supra*). As células transformadas foram cultivadas *overnight* na presença de auxiliador de fago M13-K07 (New England Biolabs, Beverly, MA) para produzir partículas de fago que encapsulam o DNA de fagomídeos e exibem fragmentos de Fab em suas superfícies. A biblioteca combinada contém mais que 3×10^{10} membros únicos.

EXEMPLO 5

SELEÇÃO DE ANTICORPOS ESPECÍFICOS A PARTIR DE BIBLIOTECAS SXH3 *NAIVES*

Fago da biblioteca SXH3 (descrito no Exemplo 4, acima) foram ciclizados através de etapas de seleção por ligação para enriquecer clones ligantes de HER-2 humano. As seleções foram realizadas utilizando métodos de ligação descritos anteriormente (Sidhu *et al.*, *Supra*).

Placas NUNC de 96 poços *Maxisorp Immunoplates* foram revestidas e incubadas *overnight* a 4 °C, com 5 µg/mL de proteína alvo (HER-2 humano) e bloqueadas por 2 horas com uma solução de PBT (tampão fosfato

contendo adicionalmente 0,2% BSA e 0,05% de *Tween 20* (Sigma)). Após o crescimento *overnight* a 37 °C, os fagos foram concentrados por precipitação com PEG/NaCl e foram ressuspendidos em PBT, como descrito anteriormente (Sidhu *et al.*, *Supra*). A solução de Fago (cerca de 10^{12} fago/mL) foram adicionados à placa *Immunoplate* revestida. Após duas horas de incubação para permitir a ligação do fago, as placas foram lavadas dez vezes com PBT. Os fago ligados foram eluídos com 0,1 M de HCl por dez minutos e os eluentes foram neutralizados com 1,0 M de base Tris. Os fagos eluídos foram amplificados em *E. coli XL-1-blue* e utilizadas para novas etapas de seleção.

As bibliotecas foram submetidas a seis etapas de seleção contra a proteína alvo. Clones individuais de cada etapa de seleção foram cultivados em palcas de 96 poços em 500 µL de caldo de 2YT complementado com carbenicilina e M13-K07. O sobrenadante da cultura foi utilizada diretamente em fago ELISA (Sidhu *et al.*, *Supra*) para detectar Fabs exibidos por fago que se ligaram nas placas revestidas com a proteína alvo, mas não se ligaram as placas revestidas com BSA. Ligantes específicos foram definidos como aqueles clones de fago que exibiram um sinal de ELISA de, no mínimo, 10 vezes maior nas placas revestidas com a proteína alvo, em comparação com placas revestidas com BSA. Clones individuais foram selecionados depois de 4, 5 e 6 etapas de seleção para se ligarem ao HER-2 humano. Os ligantes específicos foram submetidos à análise das seqüências. Tal como indicado na Figura 21, as bibliotecas SXH3 produzem ligantes específicos para a proteína alvo.

Dos 72 clones identificados que se ligam especificamente ao HER-2, 27 delas tiveram seqüências de CDR únicas (Vide, Figura 21A). As seqüências únicas caíram em 3 categorias: a) seqüências CDR com posições aleatorizadas limitadas a duas partes Tyr/Ser (clones Nos: B1-5 e B28); b) seqüências CDR com posições aleatorizadas limitadas a Trp/Ser (clones Nos: B6-24); e c) seqüências CDR com posições aleatorizadas limitadas a Phe/Ser

(clones Nos: B25-27). Estes clones foram também altamente específicos para HER2 e não apresentaram reatividade cruzada com as outras cinco proteínas controle, VEGF humano, DR5 humano, insulina humana, neutravidina, IGF-1 humano ou HGH (vide, Figura 21B). A concentração inibitória para cada clone é exibida na Figura 21B.

Um teste de ELISA por fago foi utilizado para testar a capacidade de todos os clones de reagirem cruzadamente com um painel de seis antígenos diferentes do antígeno alvo. Os fagos foram produzidos em placas de 96 poços, tal como descrito e o sobrenadante foi diluído de 3 vezes em tampão PBT. O sobrenadante de fago diluído foi transferido para placas revestidas com VEGF humano, HER2 humano, DR5 humano, insulina humana, neutravidina, IGF-1 humano, HGH ou BSA e incubados durante uma hora, sob agitação suave à temperatura ambiente. As placas foram lavadas em PBS incluindo 0,05% de *Tween 20* e foram incubadas por 30 min com conjugado peroxidase de rábano silvestre /anticorpo anti-M13 (diluição 1:5000 em tampão PBT) (phamacia). As placas foram lavadas, desenvolvidas com substrato tetrametílbenzidina (TMB) (*Kirkegaard and Perry Laboratories*), e apagadas com 1,0 M de H_3PO_4. A absorbância foi determinada espectrofotometricamente a 450 nm. A afinidade de ligação fraca foi definida como um sinal de cerca de 0,2 a 2,0, e a afinidade de ligação forte foi definida como um sinal de cerca de 2,0. Os resultados para os clones que se ligam a HER2 são exibidos na Figura 21B. Como mostra a Figura 25, dos clones isolados da SXH3, os clones S:R exibiram uma média de ligação não específica maior (OD de 0,5-0,6 a 450 nm pelo teste de ELISA), enquanto os clones S:W, S:Y, e S:F exibiram níveis baixos ou médio de ligação não específica (OD de 0-0,1 a 450 nm pelo teste de ELISA).

Um teste de competição com ELISA por fago foi utilizado para estimar afinidade de ligação ao HER-2 de Fabs exibidos por fagos. Os fagos foram produzidos em placas de 96 poços, tal como descrito anteriormente, e

sobrenadante foi diluído seriadamente em tampão PBT e, em seguida, incubados em placas revestidas com HER2 por 15 minutos. As placas foram lavadas em PBS incluindo 0,05% de *Tween 20* e foram incubadas durante 30 minutos com conjugado peroxidase de rábano silvestre /anticorpo anti-M13 (diluição 1:5000 em tampão PBT) (phamacia). As placas foram lavadas, desenvolvidas com substrato tetrametílbenzidina (TMB) (*Kirkegaard and Perry Laboratories*), e apagadas com 1,0 M de H_3PO_4. A absorbância foi determinada espectrofotometricamente a 450 nm para determinar a concentração de fago dando um sinal de saturação de ~ 50%. Uma concentração sub saturada fixada de fago foi diluída duas vezes em tampão PBT contendo diluições seriadas em duplicatas da proteína HER-2 a partir de 250 nM de HER-2 a 0,12 nM de HER-2. As misturas foram incubadas durante uma hora, sob agitação suave à temperatura ambiente, e foram transferidas para placas revestidas com HER2 e foram então incubadas durante 15 minutos. As placas foram lavadas e tratadas exatamente como descrito anteriormente. A afinidade de ligação foi estimada como valore IC_{50} (definido como a concentração de antígeno que bloqueou 50% da ligação de fago nos antígenos imobilizados). Os resultados são exibidos na Figura 21B.

EXEMPLO 6

CONSTRUÇÃO DE BIBLIOTECAS DE FAB EXIBIDAS POR FAGO COM RESÍDUOS DE CDR ENRIQUECIDO EM SER E PHE, ARG, TRP OU TYR

Bibliotecas de Fab exibidas por fago foram construídas utilizando um vetor fagomídeo, Fab-C, que resultou na exibição de moléculas Fab bivalente dimerizadas por uma cisteína livre inserida entre o Fab da cadeia pesada e o domínio C-terminal do gene-3 da proteína secundária da cápside (P3C), como descrito previamente no Exemplo 1.

Quatro bibliotecas foram construídas: SFH3, SRH3, SWH3 e SYH3. As bibliotecas foram construídas com resíduos aleatorizados em todas

as três CDRs e a CDR3 da cadeia leve. Cada biblioteca foi aleatorizada nas posições: 91-94 e 96 de CDRL3, posições 28 e 30-33 da CDRH1, posições50, 52-54, 56 e 58 da CDRH2 e posições 95-100, 100a a 100m da CDRH3. O tipo e relação do aminoácido permitido a cada uma das posições aleatorizada estão ilustrados na Figura 22. Além disso, o comprimento do CDRH3 foi variado, utilizando oligonucleotídeos que substituíram os seis códons do tipo selvagem entre as posições 95 e 100 com 4 a 17 códons. O tipo e a relação de aminoácidos permitidas nessas posições eram as mesmas que as descritas na Figura 22 para as posições 95-100 da CDRH3.

Bibliotecas foram construídas utilizando o método de Kunkel (Kunkel, TA, Roberts, JD & Zakour, RA, *Methods Enzymol.* (1987), 154, 367-382), com métodos anteriormente descritos (Sidhu, SS, Lowman, HB, Cunningham, BC & Wells, JA, *Methods Enzymol.* (2000), 328, 333-363). Uma versão única "molde de parada" do vetor de exibição do Fab, Fab-C foi utilizada para gerar todas as quatro bibliotecas, como descrito no Exemplo 1.

Oligonucleotídeos mutagênicos com códons de degenerescência nas posições a serem diversificadas, foram utilizados para simultaneamente (a) introduzir diversidades em CDR e (b) reparar dos códons de parada. As seqüências destes oligonucleotídeos mutagênicos são exibidas nas Figuras 20 e 23. Para todas as bibliotecas SF-superfície, diversidade foi introduzida no CDR-L3, CDR-H1 e CDR-H2 com oligonucleotídeos L3-SF, H1-SF e H2-SF, respectivamente (SEQ ID Nos:) (Figura 23) e a diversidade foi introduzida noCDR-H3 com uma mistura equimolar de oligonucleotídeos H3-SF4, H3-SF5, H3-SF6, H3-SF7, H3-SFS, H3-SF9, H3-SF10, H3-SF11, H3-SF12, H3-SF13, H3-SF14, H3-SF15, H3-SF16, e H3-SF17 (SEQ ID Nos: 649-662) (Figura 20 C).

Para a biblioteca SR-superfície, a diversidade foi introduzida no CDR-L3, CDR-H1 e CDR-H2 com oligonucleotídeos L3-SR, H1-SR e H2-SR, respectivamente (SEQ ID Nos:) (Figura 23) e a diversidade foi introduzida no

CDR-H3 com uma mistura equimolar de oligonucleotídeos H3-SR4, H3-SR5, H3-SR6, H3-SR7, H3-SR8, H3-SR9, H3-SR10, H3-SR11, H3-SR12, H3-SR13, H3-SR14, H3-SR15, H3-SR16, e H3-SR17 (SEQ ID Nos: 733-746) (Figura20I).

Para a biblioteca SW-superfície, a diversidade foi introduzida no CDR-L3, CDR-H1 e CDR-H2 com oligonucleotídeos L3-SW, H1-SW e H2-SW, respectivamente (SEQ ID Nos: 747-760) (Figura 23) e a diversidade foi introduzida no CDR-H3 com uma mistura equimolar de oligonucleotídeos H3-SW4, H3-SW5, H3-SW6, H3-SW7, H3-SW8, H3-SW9, H3-SW10, H3-SW11, H3-SW12, H3-SW13, H3-SW14, H3-SW15, H3-SW16, e H3-SW17 (SEQ ID Nos: 761-774) (Figura 20K).

Para a biblioteca SY-superfície, a diversidade foi introduzida no CDR-L3, CDR-H1 e CDR-H2 com oligonucleotídeos L3, H1 e H2, respectivamente (SEQ ID Nos:) (Figura 20A) e a diversidade foi introduzida no CDR-H3 com uma mistura equimolar de oligonucleotídeos H3-SY4, H3-SY5, H3-SY6, H3-SY7, H3-SY8, H3-SY9, H3-SY10, H3-SY11, H3-SY12, H3-SY13, H3-SY14, H3-SY15, H3-SY16, e H3-SY17 (SEQ ID Nos: 775-788) (Figura 20L).

Os oligonucleotídeos mutagênicos para todos os CDRs foram aleatorizados para ser incorporado simultaneamente em uma única reação de mutagênese, assim a incorporação simultânea de todos os oligonucleotídeos mutagênicos resultou na introdução da diversidade projetada em cada posição e, reparando simultaneamente todos os códons de parada TAA. Assim, um quadro de leitura aberto foi gerado para codificar uma biblioteca Fab fundida a uma ponte de cisteína homodimerizante e P3C. Seguindo mutagênese, as vinte bibliotecas foram combinadas para criar uma única biblioteca, denominada biblioteca SX-superfície.

As reações de mutagênese foram eletroporadas em *E. coli SS320* (Sidhu *et al.*, *Supra*). As células transformadas foram cultivadas *overnight* na presença de auxiliador de fago M13-K07 (New England Biolabs, Beverly, MA)

para produzir partículas de fago que encapsulam o DNA de fagomídeos e exibem fragmentos de Fab em suas superfícies. A biblioteca combinada contém mais que 3×10^{10} membros únicos.

EXEMPLO 7

SELEÇÃO DE ANTICORPOS ESPECÍFICOS A PARTIR DE BIBLIOTECAS SX- SUPERFÍCIE *NAIVES*

Fago da biblioteca SX-Superfície (descrito no Exemplo 6, acima) foram ciclizados através de etapas de seleção por ligação para enriquecer clones ligantes de HER-2 humano. As seleções foram realizadas utilizando métodos de ligação descritos anteriormente (Sidhu *et al.*, *Supra*).

Placas NUNC de 96 poços *Maxisorp Immunoplates* foram revestidas e incubadas *overnight* a 4 °C, com 5 µg/mL de proteína alvo (HER-2 humano) e bloqueadas por 2 horas com uma solução de PBT (Sigma). Após o crescimento *overnight* a 37 °C, os fagos foram concentrados por precipitação com PEG/NaCl e foram ressuspendidos em PBT, como descrito anteriormente (Sidhu *et al.*, *Supra*). A solução de Fago (cerca de 10^{12} fago/mL) foram adicionados à placa *Immunoplate* revestida. Após duas horas de incubação para permitir a ligação do fago, as placas foram lavadas dez vezes com PBT. Os fago ligados foram eluídos com 0,1 M de HCl por dez minutos e os eluentes foram neutralizados com 1,0 M de base Tris. Os fagos eluídos foram amplificados em *E. coli XL-1-blue* e utilizadas para novas etapas de seleção.

As bibliotecas foram submetidas a seis etapas de seleção contra a proteína alvo. Clones individuais de cada etapa de seleção foram cultivados em palcas de 96 poços em 500 µL de caldo de 2YT complementado com carbenicilina e M13-K07. O sobrenadante da cultura foi utilizada diretamente em fago ELISA (Sidhu *et al.*, *Supra*) para detectar Fabs exibidos por fago que se ligaram nas placas revestidas com a proteína alvo, mas não se ligaram as placas revestidas com BSA. Ligantes específicos foram definidos como aqueles

clones de fago que exibiram um sinal de ELISA de, no mínimo, 10 vezes maior nas placas revestidas com a proteína alvo, em comparação com placas revestidas com BSA. Clones individuais foram selecionados depois de 4, 5 e 6 etapas de seleção para se ligarem ao HER-2 humano. Os ligantes específicos foram submetidos à análise das seqüências. Tal como indicado na Figura 21, as bibliotecas SX-Superfície produzem ligantes específicos para a proteína alvo.

Dos 81 clones identificados que se ligam especificamente ao HER-2, 27 delas tiveram seqüências de CDR únicas (Vide, Figura 24A). As seqüências únicas caíram em 2 categorias: (a) seqüências CDR com posições aleatorizadas limitadas ao binário Tyr/Ser (clones Nos: G49-61); (b) seqüências CDR com posições aleatorizadas limitadas ao binário Trp/Ser (clones Nos: G29-48). Os clones Tyr/Ser foram altamente específicos para HER2 e não apresentaram reatividade cruzada com as outras cinco proteínas controle, VEGF humano, DR5 humano, insulina humana, neutravidina, IGF-1 humano ou HGH (vide, Figura 24B). A concentração inibitória para cada clone é exibida na Figura 24B.

Um teste de ELISA por fago foi utilizado para testar a capacidade de todos os clones de reagirem cruzadamente com um painel de seis antígenos diferentes do antígeno alvo. Os fagos foram produzidos em placas de 96 poços, tal como descrito e o sobrenadante foi diluído de 3 vezes em tampão PBT. O sobrenadante de fago diluído foi transferido para placas revestidas com VEGF humano, HER2 humano, DR5 humano, insulina humana, neutravidina, IGF-1 humano, HGH ou BSA e incubados durante uma hora, sob agitação suave à temperatura ambiente. As placas foram lavadas em PBS incluindo 0,05% de *Tween 20* e foram incubadas por 30 min com conjugado peroxidase de rábano silvestre /anticorpo anti-M13 (diluição 1:5000 em tampão PBT) (phamacia). As placas foram lavadas, desenvolvidas com substrato tetrametílbenzidina (TMB) (*Kirkegaard and Perry Laboratories*), e apagadas com 1,0 M de H_3PO_4. A absorbância foi determinada espectrofotometricamente

a 450 nm. A afinidade de ligação fraca foi definida como um sinal de cerca de 0,2 a 2,0 e a afinidade de ligação forte foi definida como um sinal de cerca de 2,0. Os resultados para os clones SX-superfície são exibidos na Figura 24B. Como mostra a Figura 27, dos clones isolados da biblioteca SX- superfície, os clones S:R e S:W exibiram uma média de ligação não específica maior (OD de 0,5-0,6 e aproximadamente OD 4,0 respectivamente a 450 nm pelo teste de ELISA), enquanto os clones S:Y e S:F exibiram níveis baixos ou médio de ligação não específica (OD de 0-0,1 a 450 nm pelo teste de ELISA).

Um teste de competição com ELISA por fago foi utilizado para estimar afinidade de ligação ao HER-2 de Fabs exibidos por fagos. Os fagos foram produzidos em placas de 96 poços, tal como descrito anteriormente, e sobrenadante foi diluído seriadamente em tampão PBT e, em seguida, incubados em placas revestidas com HER2 por 15 minutos. As placas foram lavadas em PBS incluindo 0,05% de *Tween 20* e foram incubadas durante 30 minutos com conjugado peroxidase de rábano silvestre /anticorpo anti-M13 (diluição 1:5000 em tampão PBT) (phamacia). As placas foram lavadas, desenvolvidas com substrato tetrametílbenzidina (TMB) (*Kirkegaard and Perry Laboratories*), e apagadas com 1,0 M de H_3PO_4. A absorbância foi determinada espectrofotometricamente a 450 nm para determinar a concentração de fago dando um sinal de saturação de ~ 50%. Uma concentração sub saturada fixada de fago foi diluída duas vezes em tampão PBT contendo diluições seriadas em duplicatas da proteína HER-2 a partir de 250 nM de HER-2 a 0,12 nM de HER-2. As misturas foram incubadas durante uma hora, sob agitação suave à temperatura ambiente, e foram transferidas para placas revestidas com HER2 e foram então incubadas durante 15 minutos. As placas foram lavadas e tratadas exatamente como descritas acima. A afinidade de ligação foi estimada como valore IC_{50} (definido como a concentração de antígeno que bloqueou 50% da ligação de fago nos antígenos imobilizados). Os resultados são

exibidos na Figura 24B.

Com base nesta análise, a análise dos clones ligantes de HER2 a partir da biblioteca SXH3 (Exemplo 6), e da biblioteca YSGR-AD (Exemplo 1), proteínas Fab solúveis de três clones (clone Nos.: 42 (YSGR-A) e B11 (SXH3) e G54 (SX-superfície)), foram purificados e submetidas ao ensaio de ressonância plasmônica de superfície utilizando para a ligação ao HER2 humano. Os dados de BIAcore® foram obtidos de acordo com Chen *et al.* J. Mol. Biol. (1999), 293(4): 865-81. Resumidamente, a afinidade de ligação dos Fabs purificados para HER2 humano foram calculados a partir das constantes de associação e dissociação mensuradas utilizando o sistema ressonância plasmônica de superfície BIAcore ®-A100 (BIACORE, Inc., Piscataway, NJ). O HER-2 foi covalentemente acoplado a um chips de biosensores em duas concentrações diferentes utilizando N-etil-N'-(3-dimetilaminopropil)-carbodiimida (EDC) e N-hidroxisucinimida (SNS) de acordo com as instruções do fornecedor (BIACORE, Inc., Piscataway, NJ). O HER-2 foi diluído com 10 mM de acetato de sódio, pH 5,0, para aproximadamente 2,5 ou 5 µg/ml. Alíquotas de HER2 foram injetadas a uma velocidade de fluxo de 5 µl/minuto para atingir aproximadamente 50 a 170 unidades de resposta (RU) de proteína acoplada. Uma solução de 1M de etanolamina é adicionada como um agente de bloqueio. Para a mediação cinética, diluições seriadas em duplicatas de cada Fab foram injetados em HBT a 25 °C em uma taxa de fluxo de cerca de 10 µl/min sobre cada fluxo de células. A velocidade de associação (k_{on}) foram calculadas utilizando uma curva de ligação utilizando o *BIAcore Evaluation Software package* (BIACORE, Inc., Piscataway, NJ) utilizando a montagem global e local de dois pontos e combinando os dados de ambos fluxos de células A constante do equilíbrio de dissociação (K_D) é calculado como a relação k_{off}/k_{on}. Os dados BIAcore ® estão resumidos nas Figura 26A e B. O clone B1L tinha um k_a de $1,9 \times 10^6$ M^{-1} S^{-1}, um k_d de $1,7 \times 10^{-3}$ S^{-1} e um K_D de

890 nM. O R_{max1} para o experimento com o clone B1l foi de 19 RU, e R_{max2} para o experimento com o clone B1l foi de 29 RU. (Figura 26A) Clone G54 teve um k_a de 2,0 x 10^5 M^{-1} S^{-1}, um k_d de 2,2 x 10^{-3} S^{-1} e um K_D de 11 nM. O R_{max1} para o experimento com o clone G54 foi de 21 RU e R_{max2} para o experimento com o clone G54 foi de 34 RU. (Figura 26A) O clone YSGR-A-42 teve um k_a de 2,7 x 10^6 $M^{-1}S^{-1}$, um K_d de 1,5 x 10^{-3} s^{-1}, e um K_D de 570 pM. O R_{max1} para o experimento com o clone 42 foi 25 RU, e R_{max2} para o experimento com o clone 42 foi 38 RU. (Figura 26 ter) O clone contendo triptofano (B1l) teve uma velocidade de k_{on} e K_D correspondentemente menor do que o clone contendo tirosina (G54).

Para estudar a ligação dos anticorpos anti-HER2 ao HER2 expresso em células de mamíferos, a ligação da proteína Fab purificada dos clones 42 (YSGR-A), B1l (SXH3), G54 (SX-superfície), e G37 (SX-superfície) a células fibroblastos NR6 que super-expressam HER2 (NR6-HER2) foi estudada por citometria de fluxo. Um milhão de células NR6-HER2 foram incubadas com 10 µg/ml de Fab durante 1 hora, seguido pela incubação com um conjugado Alexa488-Anticorpo murino anti- IgG humano por 1 hora. Como controle negativo, Fab ligado a células NR6 que não expressam foram estudadas. Como controle positivo, Fab 4D5 foi utilizado. Assim como demonstrado na Figura 27, os clones 42, B1l, G54, G37 se ligam especificamente ao HER2 em células NR6.

Um teste de competição com ELISA foi utilizado para avaliar a competição por ligação com Omnitarg, Herceptin e entre alguns tipos de clones HER2 na forma de IgG (vide, Figura 28 para as seqüências CDR dos clones relevantes). A proteína HER2 biotinilada foi diluída serialmente de 200 nM até 0,39 mM em tampão PBT e então incubada em placas revestidas com proteínas IgG purificadas por 15 minutos. As placas foram lavadas em PBS incluindo 0,05% de *Tween 20* e foram incubadas durante 30 minutos com

conjugado peroxidase de rábano silvestre /anticorpo anti-M13 (diluição 1:5000 em tampão PBT) (phamacia). As placas foram lavadas, desenvolvidas com substrato tetrametílbenzidina (TMB) (*Kirkegaard and Perry Laboratories*), e apagadas com 1,0 M de H_3PO_4. A absorbância foi determinada espectrofotometricamente a 450 nm para determinar a concentração de HER2 biotinilado dando um sinal de saturação de ~ 50%. Uma concentração sub saturada fixada de proteína HER2 biotinilada foi diluída duas vezes em tampão PBT contendo 100 mM de proteínas IgG purificadas. As misturas foram incubadas durante uma hora, sob agitação suave à temperatura ambiente, e foram transferidas para placas revestidas com proteínas IgG purificadas e foram então incubadas durante 15 minutos. As placas foram lavadas e tratadas exatamente como descritas acima. Como mostra a Figura 29, nenhum dos IgG ligantes de HER2 bloqueou a ligação do HER2 biotinilado, tanto com Omnitarg quanto com Herceptin. Os IgGs bloquearam a ligação entre eles em dois grupos. Um grupo composto pelos clones B1l, G37, G54, e YSGR-A-42 competiram por um mesmo epítopo e bloquearam a ligação ao HER2 biotinilado, que havia sido previamente incubado com qualquer um desses clones. Um segundo grupo composto pelos clones YSGR-A-27, B27, G43 e YSGR-D-104 competiram pelo mesmo epítopo ao HER2 e bloquearam a ligação ao HER2 biotinilado. Todos os clones do grupo um possuem maior afinidade de ligação do que os clones do grupo dois.

Todas as publicações (incluindo as patentes e os pedidos de patentes) citadas no presente são incorporadas na sua totalidade pela referência.

TABELA 2

Polipeptídeo DR5-ECD humano

MSALLILALVGAAVADYKDDDDKLSALITQQDLAPQQRVAPQQKRSSPSEG LCPPGHHIS

EDGRDCISCKYGQDYSTHWKDLLFCLRCTRCDSGEVELSPCTTTRNTVCQC
EEGTFREED
SPEMCRKCRTGCPRGMVKVGDCTPWSDIECVHKESGTKHSGEAPAVEETVT
SSPGTPASP

CSLS (SEQ ID No: 595)

Polipeptídeo DR5 humano

meqrgqnapa asgarkrhgp gpreargarp glrvpktlvl vvaavlllvs aesalitqqd lapqqraapq qkrsspsegl cppghhised grdcisckyg qdysthwndl lfclrctrcd sgevelspct ttrntvcqce egtfreedsp emcrkcrtgc prgmvkvgdc tpwsdiecvh kesgiiigvt vaavvlivav fvcksllwkk vlpylkgics ggggdpervd rssqrpgaed nvlneivsil qptqvpeqem evqepaeptg vnmlspgese hllepaeaer sqrrrllvpa negdptetlr qcfddfadlv pfdsweplmr klglmdneik vakaeaaghr dtlytmlikw vnktgrdasv htlldaletl gerlakqkie dhllssgkfm ylegnadsal s (SEQ ID No: 604)

DR5-ECD MURINO

GLQRPEESPSRGPCLAGQYLSEGNCKPCREGIDYTSHSNHSLDSCILCTVCKE
DKWETR
CNTrTNTVCRCKPGTFEDKDSPEICQSCSNCTDGEEELTSCTPRENRKCVSKT
AWASWHK

SEQ ID No: 605)

SEQÜÊNCIA DO POLIPEPTÍDEO APO-2L

1
MetAlaMetMetGluValGlnGlyGlyProSerLeuGlyGlnThrCysValLeuIleValIlePheThr
ValLeuLeuGlnSerLeuCys
31
ValAlaValThrTyrValTyrPheThrAsnGluLeuLysGlnMetGlnAspLysTyrSerLysSerGl
yIleAlaCysPheLeuLysGlu
61
AspAspSerTyrTrpAspProAsnAspGluGluSerMetAsnSerProCysTrpGlnValLysTrp

GlnLeuArgGlnLeuValArgLys

91

MetIleLeuArgThrSerGluGluThrIleSerThrValGlnGluLysGlnGlnAsnIleSerProLeuV

alArgGluArgGlyProGln

121

ArgValAlaAlaHisIleThrGlyThrArgGlyArgSerAsnThrLeuSerSerProAsnSerLysAsn

GluLysAlaLeuGlyArgLys

151

IleAsnSerTrpGluSerSerArgSerGlyHisSerPheLeuSerAsnLeuHisLeuArgAsnGlyGl

uLeuValIleHisGluLysGly

181

PheTyrTyrIleTyrSerGlnThrTyrPheArgPheGlnGluGluIleLysGluAsiiThrLysAsnAsp

LysGlnMetValGlnTyrIle

211

TyrLysTyrThrSerTyrProAspProIleLeuLeuMetLysSerAlaArgAsnSerCysTrpSerLy

sAspAlaGluTyrGlyLeuTyr

241

SerIleTyrGlnGlyGlyIlePheGluLeuLysGluAsnAspArgIlePheValSerValThrAsnGlu

HisLeuIleAspMetAspHis

271

GluAlaSerPhePheGlyAlaPheLeuValGly (SEQ ID No: 606)

SEQÜÊNCIA DE AMINOÁCIDOS 114-281 DA APO-2L

VRERGPQRVA AHITGTRGRS NTLSSPNSKN EKALGRKINS WESSRSGHSF LSNLHLRNGE LVEHEKGFYY IYSQTYFRFQ EEIKENTKND KQMVQYIYKY TSYPDPELLM KSARNSCWSK DAEYGLYSIY QGGEFELKEN DRIFVSVTNE HLIDMDHEAS FFGAFLVG (SEQ ID No: 607).

LISTAGEM DE SEQUENCIA

<110> Sidhu, Sachdev S.
Birtalan, Sara
Fellouse, Frederic

<120> POLIPEPTÍDEOS LIGANTES E SEUS USOS

<130> 11669.291USU1

<140> NOVO DEPÓSITO
<141> 12-01-2006

<150> 60/742,185
<151> 12-02-2005

<150> 60/805,553
<151> 22-06-2006

<160> 1013

<170> PatentIn version 3.3

<210> 1
<211> 109
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Domínio variável de cadeia leve de 4D5 sintético

<400> 1

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

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

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

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

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

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

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

<210> 2
<211> 120

<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Domínio variável de cadeia pesada de 4D5 sintético

<400> 2

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

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

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

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

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

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

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

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 3
<211> 35
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> CDRL3 Sintético

<400> 3

Gly Arg Met Lys Gln Leu Glu Asp Lys Val Glu Glu Leu Leu Ser Lys
1 5 10 15

Asn Tyr His Leu Glu Asn Glu Val Ala Arg Leu Lys Lys Leu Val Gly
20 25 30

Glu Arg Gly
35

<210> 4
<211> 11
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> CDRH3 Sintético

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(1)
<223> X é independentemente de Y, G, S, R, A, D, E, F, H, I, K, L, M, N, P, Q, T, V, ou W

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (2)..(2)
<223> X é independentemente de Y, G, S, R, A, D, E, F, H, I, K, L, M, N, P, Q, T, V, ou W

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (3)..(3)
<223> X é independentemente de Y, G, S, R, A, D, E, F, H, I, K, L, M, N, P, Q, T, V, ou W

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (4)..(4)
<223> X é independentemente de Y, G, S, R, A, D, E, F, H, I, K, L, M, N, P, Q, T, V, ou W

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (5)..(5)
<223> X é independentemente de Y, G, S, R, A, D, E, F, H, I, K, L, M, N, P, Q, T, V, ou W

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (6)..(6)
<223> X é independentemente de Y, G, S, R, A, D, E, F, H, I, K, L, M, N, P, Q, T, V, ou W

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (6)..(6)
<223> X é independentemente de Y, G, S, R, A, D, E, F, H, I, K, L, M, N, P, Q, T, V, ou W, e pode ser vários comprimentos

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (7)..(7)
<223> X é independentemente de Y, G, S, R, A, D, E, F, H, I, K, L, M, N, P, Q, T, V, ou W

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (8)..(8)
<223> X é independentemente de Y, G, S, R, A, D, E, F, H, I, K, L, M, N, P, Q, T, V, ou W

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (9)..(9)
<223> X é independentemente de Y, G, S, R, A, D, E, F, H, I, K, L, M, N, P, Q, T, V, ou W

<400> 4

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Asp Tyr
1 5 10

<210> 5
<211> 12
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Sequência de articulação de cadeia pesada sintética

<400> 5

Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly
1 5 10

<210> 6
<211> 23
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> huMAb4D5-8 LC-FR1 sintético

<400> 6

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys
20

<210> 7
<211> 15
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> huMAb4D5 LC-FR2 sintético

<400> 7

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

<210> 8
<211> 32
<212> PRT

<213> Artificial

<220>
<223> huMAb4D5 LC-FR3 sintético

<400> 8

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

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

<210> 9
<211> 10
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> huMAb4D5 LC-FR4 sintético

<400> 9

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

<210> 10
<211> 25
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> huMAb4D5-8 HC-FR1 sintético

<400> 10

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser
20 25

<210> 11
<211> 13
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> huMAb4D5 HC-FR2 sintético

<400> 11

Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
1 5 10

<210> 12

<211> 30
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> huMAb4D5 HC-FR3 sintético

<400> 12

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

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

<210> 13
<211> 11
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> huMAb4D5 HC-FR4 sintético

<400> 13

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

<210> 14
<211> 23
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> huMAb4D5-8 LC-FR1 sintético

<400> 14

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys
20

<210> 15
<211> 15
<212> PRT
<213> Artficial

<400> 15

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

<210> 16
<211> 32

<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> huMAb4D5 LC-FR3 sintético

<400> 16

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

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

<210> 17
<211> 10
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> huMAb4D5 LC-FR4 sintético

<400> 17

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

<210> 18
<211> 25
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> huMAb4D5-8 HC-FR1 sintético

<400> 18

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser
20 25

<210> 19
<211> 13
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> huMAb4D5 HC-FR2 sintético

<400> 19

Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
1 5 10

<210> 20
<211> 30
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> huMAb4D5 HC-FR3 sintético

<400> 20

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

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

<210> 21
<211> 11
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> huMAb4D5 HC-FR4 sintético

<400> 21

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

<210> 22
<211> 10
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> CDRH1 sintético

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (3)..(3)
<223> X é Y ou S

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (5)..(5)
<223> X é Y ou S

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (6)..(6)
<223> X é Y ou S

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (7)..(7)
<223> X é Y ou S

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (8)..(8)
<223> X é Y ou S

<400> 22

Gly Phe Xaa Ile Xaa Xaa Xaa Xaa Ile His
1 5 10

<210> 23
<211> 17
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> CDRH2 sintético

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(1)
<223> X é Y ou S

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (3)..(3)
<223> X é Y ou S

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (5)..(5)
<223> X é Y ou S

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (6)..(6)
<223> X é Y ou S

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (8)..(8)
<223> X é Y ou S

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (10)..(10)
<223> X é Y ou S

<400> 23

Xaa Ile Xaa Pro Xaa Xaa Gly Xaa Thr Xaa Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 24

<211> 21
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> CDRH3 sintético

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(1)
<223> X é Y, G, ou S

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (2)..(2)
<223> X é Y, G, ou S

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (3)..(3)
<223> X é Y, G, ou S

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (4)..(4)
<223> X é Y, G, ou S

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (5)..(5)
<223> X é Y, G, ou S

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (6)..(6)
<223> X é Y, G, ou S

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (7)..(7)
<223> X é Y, G, ou S, ou nenhum aminoácido

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (8)..(8)
<223> X é Y, G, ou S, ou nenhum aminoácido

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (9)..(9)
<223> X é Y, G, ou S, ou nenhum aminoácido

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (10)..(10)
<223> X é Y, G, ou S, ou nenhum aminoácido

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (11)..(11)
<223> X é Y, G, ou S, ou nenhum aminoácido

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (12)..(12)
<223> X é Y, G, ou S, ou nenhum aminoácido

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (13)..(13)
<223> X é Y, G, ou S, ou nenhum aminoácido

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (14)..(14)
<223> X é Y, G, ou S, ou nenhum aminoácido

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (15)..(15)
<223> X é Y, G, ou S, ou nenhum aminoácido

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (16)..(16)
<223> X é Y, G, ou S, ou nenhum aminoácido

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (17)..(17)
<223> X é Y, G, ou S, ou nenhum aminoácido

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (18)..(18)
<223> X é G ou A

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (19)..(19)
<223> X é I, M, L, ou F

<400> 24

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
1 5 10 15

Xaa Xaa Xaa Asp Tyr
20

<210> 25
<211> 9
<212> PRT

<213> Artificial

<220>
<223> CDRL3 sintético

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (3)..(3)
<223> X é Y ou S

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (4)..(4)
<223> X é Y ou S

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (5)..(5)
<223> X é Y ou S

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (6)..(6)
<223> X éY ou S

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (8)..(8)
<223> X é Y ou S

<400> 25

Gln Gln Xaa Xaa Xaa Xaa Pro Xaa Thr
1 5

<210> 26
<211> 21
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> CDRH3 sintético

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(1)
<223> X é Y, R, ou S

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (2)..(2)
<223> X é Y, R, ou S

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (3)..(3)

<223> X é Y, R, ou S

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (4)..(4)
<223> X é Y, R, ou S

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (5)..(5)
<223> X é Y, R, ou S

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (6)..(6)
<223> X é Y, R, ou S

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (7)..(7)
<223> X é Y, S, ou R, ou não esta presente

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (8)..(8)
<223> X é Y, S, ou R, ou não esta presente

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (9)..(9)
<223> X é Y, S, ou R, ou não esta presente

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (10)..(10)
<223> X é Y, S, ou R, ou não esta presente

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (11)..(11)
<223> X é Y, S, ou R, ou não esta presente

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (12)..(12)
<223> X é Y, S, ou R, ou não esta presente

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (13)..(13)
<223> X é Y, S, ou R, ou não esta presente

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (14)..(14)
<223> X é Y, S, ou R, ou não esta presente

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (15)..(15)
<223> X é Y, S, ou R, ou não esta presente

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (16)..(16)
<223> X é Y, S, ou R, ou não esta presente

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (17)..(17)
<223> X é Y, S, ou R, ou não esta presente

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (18)..(18)
<223> X é G ou A

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (19)..(19)
<223> X é I, M, L, ou F

<400> 26

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
1 5 10 15

Xaa Xaa Xaa Asp Tyr
20

<210> 27
<211> 21
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> CDRH3 sintético

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(1)
<223> X é Y, G, R, ou S

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (2)..(2)
<223> X é Y, G, R, ou S

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (3)..(3)
<223> X é Y, G, R, ou S
<220>

<221> MISC_FEATURE
<222> (4)..(4)
<223> X é Y, G, R, ou S

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (5)..(5)
<223> X é Y, G, R, ou S

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (6)..(6)
<223> X é Y, G, R, ou S

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (7)..(7)
<223> X é Y, S, G, R, ou nenhum aminoácido

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (8)..(8)
<223> X é Y, S, G, R, ou nenhum aminoácido

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (9)..(9)
<223> X é Y, S, G, R, ou nenhum aminoácido

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (10)..(10)
<223> X é Y, S, G, R, ou nenhum aminoácido

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (11)..(11)
<223> X é Y, S, G, R, ou nenhum aminoácido

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (12)..(12)
<223> X é Y, S, G, R, ou nenhum aminoácido
<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (13)..(13)
<223> X é Y, S, G, R, ou nenhum aminoácido
<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (14)..(14)
<223> X é Y, S, G, R, ou nenhum aminoácido

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (15)..(15)
<223> X é Y, S, G, R, ou nenhum aminoácido

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (16)..(16)
<223> X é Y, S, G, R, ou nenhum aminoácido

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (17)..(17)
<223> X é Y, S, G, R, ou nenhum aminoácido

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (18)..(18)
<223> X é G ou A

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (19)..(19)
<223> X é I, M, L, ou F

<400> 27

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
1 5 10 15

Xaa Xaa Xaa Asp Tyr
20

<210> 28
<211> 21
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> CDRH3 sintético

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(1)
<223> X é Y, G, S, R, A, D, E, F, H, I, K, L, M, N, P, Q, T, V, ou W

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (2)..(2)
<223> X é Y, G, S, R, A, D, E, F, H, I, K, L, M, N, P, Q, T, V, ou W

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (3)..(3)
<223> X é Y, G, S, R, A, D, E, F, H, I, K, L, M, N, P, Q, T, V, ou W

<220>
<221> MISC_FEATURE

<222> (4)..(4)
<223> X é Y, G, S, R, A, D, E, F, H, I, K, L, M, N, P, Q, T, V, ou W

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (5)..(5)
<223> X é Y, G, S, R, A, D, E, F, H, I, K, L, M, N, P, Q, T, V, ou W

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (6)..(6)
<223> X é Y, G, S, R, A, D, E, F, H, I, K, L, M, N, P, Q, T, V, ou W

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (7)..(7)
<223> X éY, G, S, R, A, D, E, F, H, I, K, L, M, N, P, Q, T, V, W, ou nenhum aminoácido

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (8)..(8)
<223> X é Y, G, S, R, A, D, E, F, H, I, K, L, M, N, P, Q, T, V, W, ou nenhum aminoácido

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (9)..(9)
<223> X é Y, G, S, R, A, D, E, F, H, I, K, L, M, N, P, Q, T, V, W, au nenhum aminoácido

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (10)..(10)
<223> X é Y, G, S, R, A, D, E, F, H, I, K, L, M, N, P, Q, T, V, W, au nenhum aminoácido

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (11)..(11)
<223> X é Y, G, S, R, A, D, E, F, H, I, K, L, M, N, P, Q, T, V, W, ao nenhum aminoácido

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (12)..(12)
<223> X é Y, G, S, R, A, D, E, F, H, I, K, L, M, N, P, Q, T, V, W, au nenhum aminoácido

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (13)..(13)
<223> X é Y, G, S, R, A, D, E, F, H, I, K, L, M, N, P, Q, T, V,

W, au nenhum aminoácido

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (14)..(14)
<223> X é Y, G, S, R, A, D, E, F, H, I, K, L, M, N, P, Q, T, V, W, au nenhum aminoácido

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (15)..(15)
<223> X é Y, G, S, R, A, D, E, F, H, I, K, L, M, N, P, Q, T, V, W, au nenhum aminoácido

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (16)..(16)
<223> X é Y, G, S, R, A, D, E, F, H, I, K, L, M, N, P, Q, T, V, W, au nenhum aminoácido

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (17)..(17)
<223> X é Y, G, S, R, A, D, E, F, H, I, K, L, M, N, P, Q, T, V, W, au nenhum aminoácido

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (18)..(18)
<223> X é G ou A

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (19)..(19)
<223> X é I, M, L, ou F

<400> 28

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
1 5 10 15

Xaa Xaa Xaa Asp Tyr
20

<210> 29
<211> 11
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Kabat sintético consenso CDRL1

<400> 29

Arg Ala Ser Gln Asp Val Asn Thr Ala Val Ala
1 5 10

<210> 30
<211> 7
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Kabat sintético consenso CDRL2

<400> 30

Ser Ala Ser Ser Leu Tyr Ser
1 5

<210> 31
<211> 18
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> CDRH3 sintético

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(1)
<223> X é R, Y, ou M

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (2)..(2)
<223> X é Y ou R

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (3)..(3)
<223> X é Y, S, R, P, ou G

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (4)..(4)
<223> X é Y ou S

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (5)..(5)
<223> X é Y, S, R, ou H

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (6)..(6)
<223> X é R, Y, ou S

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (7)..(7)
<223> X é G, Y, ou S

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (8)..(8)
<223> X é R, Y, ou S

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (9)..(9)
<223> X é G, Y, ou S

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (10)..(10)
<223> X é R, Y, ou S

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (11)..(11)
<223> X é G, Y, ou S

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (12)..(12)
<223> X é S, Y, R, G, ou A

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (13)..(13)
<223> X é G ou Y

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (14)..(14)
<223> X is either L, M, R, G, or A

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (15)..(15)
<223> X é G, F, L, ou nenhum aminoácido

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (16)..(16)
<223> X é F ou nenhum aminoácido

<400> 31

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
1 5 10 15

Asp Tyr

<210> 32
<211> 45
<212> DNA

<213> Artificial

<220>
<223> H1 sintético

<400> 32
gcagcttctg gcttctmatt tmttmtmtmt atacactggg tgcgt 45

<210> 33
<211> 58
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> H2 sintético

<400> 33
ctggaatggg ttgcatmtat ttmtccatmt tggttmtact tmttatgccg atagcgtc 58

<210> 34
<211> 54
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> L3 sintético

<400> 34
acttattact gtcagcaatm ttmttmttmt ccatmtacgt tcggacaggg tacc 54

<210> 35
<211> 60
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> H3-A6 sintético

<220>
<221> misc_feature
<222> (19)..(21)
<223> N19 a N21 são independentemente TAT, TAC, TCA, TCT, TCC, TCG,AGT, AGC, GGA, GGT, GGC, ou GGG

<220>
<221> misc_feature
<222> (22)..(24)
<223> N22 a N24 são independentemente TAT, TAC, TCA, TCT, TCC, TCG,AGT, AGC, GGA, GGT, GGC, ou GGG

<220>
<221> misc_feature
<222> (25)..(27)
<223> N25 a N27 são independentemente TAT, TAC, TCA, TCT, TCC, TCG,AGT, AGC, GGA, GGT, GGC, ou GGG

<220>
<221> misc_feature
<222> (28)..(30)
<223> N28 a N30 são independentemente TAT, TAC, TCA, TCT, TCC, TCG, AGT, AGC, GGA, GGT, GGC, ou GGG

<220>
<221> misc_feature
<222> (31)..(33)
<223> N31 a N33 são independentemente TAT, TAC, TCA, TCT, TCC, TCG,AGT, AGC, GGA, GGT, GGC, ou GGG

<220>
<221> misc_feature
<222> (34)..(36)
<223> N34 a N36 são independentemente TAT, TAC, TCA, TCT, TCC, TCG,AGT, AGC, GGA, GGT, GGC, ou GGG

<400> 35
gtctattatt gtgctcgcnn nnnnnnnnnn nnnnnngstw tkgactactg gggtcaagga 60

<210> 36
<211> 63
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> H3-A7 sintético

<220>
<221> misc_feature
<222> (19)..(21)
<223> N19 a N21 são independentemente TAT, TAC, TCA, TCT, TCC, TCG, AGT, AGC, GGA, GGT, GGC, ou GGG

<220>
<221> misc_feature
<222> (22)..(24)
<223> N22 a N24 são independentemente TAT, TAC, TCA, TCT, TCC, TCG, AGT, AGC, GGA, GGT, GGC, ou GGG

<220>
<221> misc_feature
<222> (25)..(27)
<223> N25 a N27 são independentemente TAT, TAC, TCA, TCT, TCC, TCG, AGT, AGC, GGA, GGT, GGC, ou GGG

<220>
<221> misc_feature
<222> (28)..(30)
<223> N28 a N30 são independentemente TAT, TAC, TCA, TCT, TCC, TCG, AGT, AGC, GGA, GGT, GGC, ou GGG

<220>
<221> misc_feature
<222> (31)..(33)

<223> N31 a N33 são independentemente TAT, TAC, TCA, TCT, TCC, TCG, AGT, AGC, GGA, GGT, GGC, ou GGG

<220>
<221> misc_feature
<222> (34)..(36)
<223> N34 a N36 são independentemente TAT, TAC, TCA, TCT, TCC, TCG, AGT, AGC, GGA, GGT, GGC, ou GGG

<220>
<221> misc_feature
<222> (37)..(39)
<223> N37 a N39 são independentemente TAT, TAC, TCA, TCT, TCC, TCG, AGT, AGC, GGA, GGT, GGC, ou GGG

<400> 36
gtctattatt gtgctcgcnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnng stwtkgacta ctggggtcaa 60

gga 63

<210> 37
<211> 66
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> H3-A8 sintético

<220>
<221> misc_feature
<222> (19)..(21)
<223> N19 a N21 são independentemente TAT, TAC, TCA, TCT, TCC, TCG,AGT, AGC, GGA, GGT, GGC, ou GGG

<220>
<221> misc_feature
<222> (22)..(24)
<223> N22 a N24 são independentemente TAT, TAC, TCA, TCT, TCC, TCG, AGT, AGC, GGA, GGT, GGC, ou GGG

<220>
<221> misc_feature
<222> (25)..(27)
<223> N25 a N27 são independentemente TAT, TAC, TCA, TCT, TCC, TCG, AGT, AGC, GGA, GGT, GGC, ou GGG

<220>
<221> misc_feature
<222> (28)..(30)
<223> N28 a N30 são independentemente TAT, TAC, TCA, TCT, TCC, TCG, AGT, AGC, GGA, GGT, GGC, ou GGG

<220>
<221> misc_feature
<222> (31)..(33)
<223> N31 a N33 são independentemente TAT, TAC, TCA, TCT, TCC,

TCG, AGT, AGC, GGA, GGT, GGC, ou GGG

<220>
<221> misc_feature
<222> (34)..(36)
<223> N34 a N36 são independentemente TAT, TAC, TCA, TCT, TCC, TCG, AGT, AGC, GGA, GGT, GGC, ou GGG

<220>
<221> misc_feature
<222> (37)..(39)
<223> N37 a N39 são independentemente TAT, TAC, TCA, TCT, TCC, TCG, AGT, AGC, GGA, GGT, GGC, ou GGG

<220>
<221> misc_feature
<222> (40)..(42)
<223> N40 a N42 são independentemente TAT, TAC, TCA, TCT, TCC, TCG, AGT, AGC, GGA, GGT, GGC, ou GGG

<400> 37
gtctattatt gtgctcgcnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nngstwtkga ctactggggt 60

caagga 66

<210> 38
<211> 69
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> H3-A9 sintético

<220>
<221> misc_feature
<222> (19)..(21)
<223> N19 a N21 são independentemente TAT, TAC, TCA, TCT, TCC, TCG, AGT, AGC, GGA, GGT, GGC, ou GGG

<220>
<221> misc_feature
<222> (22)..(24)
<223> N22 a N24 são independentemente TAT, TAC, TCA, TCT, TCC, TCG, AGT, AGC, GGA, GGT, GGC, ou GGG

<220>
<221> misc_feature
<222> (25)..(27)
<223> N25 a N27 são independentemente TAT, TAC, TCA, TCT, TCC, TCG, AGT, AGC, GGA, GGT, GGC, ou GGG

<220>
<221> misc_feature
<222> (28)..(30)
<223> N28 a N30 são independentemente TAT, TAC, TCA, TCT, TCC, TCG, AGT, AGC, GGA, GGT, GGC, ou GGG

<220>
<221> misc_feature
<222> (31)..(33)
<223> N31 a N33 são independentemente TAT, TAC, TCA, TCT, TCC, TCG, AGT, AGC, GGA, GGT, GGC, ou GGG
<220>
<221> misc_feature
<222> (34)..(36)
<223> N34 a N36 são independentemente TAT, TAC, TCA, TCT, TCC, TCG, AGT, AGC, GGA, GGT, GGC, ou GGG

<220>
<221> misc_feature
<222> (37)..(39)
<223> N37 a N39 são independentemente TAT, TAC, TCA, TCT, TCC, TCG, AGT, AGC, GGA, GGT, GGC, ou GGG

<220>
<221> misc_feature
<222> (40)..(42)
<223> N40 a N42 são independentemente TAT, TAC, TCA, TCT, TCC, TCG, AGT, AGC, GGA, GGT, GGC, ou GGG

<220>
<221> misc_feature
<222> (43)..(45)
<223> N43 a N45 são independentemente TAT, TAC, TCA, TCT, TCC, TCG, AGT, AGC, GGA, GGT, GGC, ou GGG

<400> 38
gtctattatt gtgctcgcnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnngstwt kgactactgg 60

ggtcaagga 69

<210> 39
<211> 72
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> H3-A10 sintético

<220>
<221> misc_feature
<222> (19)..(21)
<223> N19 a N21 são independentemente TAT, TAC, TCA, TCT, TCC, TCG, AGT, AGC, GGA, GGT, GGC, ou GGG

<220>
<221> misc_feature
<222> (22)..(24)
<223> N22 a N24 são independentemente TAT, TAC, TCA, TCT, TCC, TCG, AGT, AGC, GGA, GGT, GGC, ou GGG

<220>
<221> misc_feature

<222> (25)..(27)
<223> N25 a N27 são independentemente TAT, TAC, TCA, TCT, TCC, TCG, AGT, AGC, GGA, GGT, GGC, ou GGG

<220>
<221> misc_feature
<222> (28)..(30)
<223> N28 a N30 são independentemente TAT, TAC, TCA, TCT, TCC, TCG, AGT, AGC, GGA, GGT, GGC, ou GGG

<220>
<221> misc_feature
<222> (31)..(33)
<223> N31 a N33 são independentemente TAT, TAC, TCA, TCT, TCC, TCG, AGT, AGC, GGA, GGT, GGC, ou GGG

<220>
<221> misc_feature
<222> (34)..(36)
<223> N34 a N36 são independentemente TAT, TAC, TCA, TCT, TCC, TCG, AGT, AGC, GGA, GGT, GGC, ou GGG

<220>
<221> misc_feature
<222> (37)..(39)
<223> N37 a N39 são independentemente TAT, TAC, TCA, TCT, TCC, TCG, AGT, AGC, GGA, GGT, GGC, ou GGG

<220>
<221> misc_feature
<222> (40)..(42)
<223> N40 a N42 são independentemente TAT, TAC, TCA, TCT, TCC, TCG, AGT, AGC, GGA, GGT, GGC, ou GGG

<220>
<221> misc_feature
<222> (43)..(45)
<223> N43 a N45 são independentemente TAT, TAC, TCA, TCT, TCC, TCG, AGT, AGC, GGA, GGT, GGC, ou GGG

<220>
<221> misc_feature
<222> (46)..(48)
<223> N46 a N48 são independentemente TAT, TAC, TCA, TCT, TCC, TCG, AGT, AGC, GGA, GGT, GGC, ou GGG

<400> 39
gtctattatt gtgctcgcnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnngs twtkgactac 60

tggggtcaag ga 72

<210> 40
<211> 75
<212> DNA
<213> Artificial
<220>

<223> H3-A11 sintético

<220>
<221> misc_feature
<222> (19)..(21)
<223> N19 a N21 são independentemente TAT, TAC, TCA, TCT, TCC, TCG, AGT, AGC, GGA, GGT, GGC, ou GGG

<220>
<221> misc_feature
<222> (22)..(24)
<223> N22 a N24 são independentemente TAT, TAC, TCA, TCT, TCC, TCG, AGT, AGC, GGA, GGT, GGC, ou GGG

<220>
<221> misc_feature
<222> (25)..(27)
<223> N25 a N27 são independentemente TAT, TAC, TCA, TCT, TCC, TCG, AGT, AGC, GGA, GGT, GGC, ou GGG

<220>
<221> misc_feature
<222> (28)..(30)
<223> N28 a N30 são independentemente TAT, TAC, TCA, TCT, TCC, TCG, AGT, AGC, GGA, GGT, GGC, ou GGG

<220>
<221> misc_feature
<222> (31)..(33)
<223> N31 a N33 são independentemente TAT, TAC, TCA, TCT, TCC, TCG, AGT, AGC, GGA, GGT, GGC, ou GGG

<220>
<221> misc_feature
<222> (34)..(36)
<223> N34 a N36 são independentemente TAT, TAC, TCA, TCT, TCC, TCG, AGT, AGC, GGA, GGT, GGC, ou GGG

<220>
<221> misc_feature
<222> (37)..(39)
<223> N37 a N39 são independentemente TAT, TAC, TCA, TCT, TCC, TCG, AGT, AGC, GGA, GGT, GGC, ou GGG

<220>
<221> misc_feature
<222> (40)..(42)
<223> N40 a N42 são independentemente TAT, TAC, TCA, TCT, TCC, TCG, AGT, AGC, GGA, GGT, GGC, ou GGG

<220>
<221> misc_feature
<222> (43)..(45)
<223> N43 a N45 são independentemente TAT, TAC, TCA, TCT, TCC, TCG, AGT, AGC, GGA, GGT, GGC, ou GGG
<220>

<221> misc_feature
<222> (46)..(48)
<223> N46 a N48 são independentemente TAT, TAC, TCA, TCT, TCC, TCG, AGT, AGC, GGA, GGT, GGC, ou GGG

<220>
<221> misc_feature
<222> (49)..(51)
<223> N49 a N51 são independentemente TAT, TAC, TCA, TCT, TCC, TCG, AGT, AGC, GGA, GGT, GGC, ou GGG

<400> 40
gtctattatt gtgctcgcnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn ngstwtkgac 60

tactggggtc aagga 75

<210> 41
<211> 78
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> H3-A12 sintético

<220>
<221> misc_feature
<222> (19)..(21)
<223> N19 a N21 são independentemente TAT, TAC, TCA, TCT, TCC, TCG, AGT, AGC, GGA, GGT, GGC, ou GGG

<220>
<221> misc_feature
<222> (22)..(24)
<223> N22 a N24 são independentemente TAT, TAC, TCA, TCT, TCC, TCG, AGT, AGC, GGA, GGT, GGC, ou GGG

<220>
<221> misc_feature
<222> (25)..(27)
<223> N25 a N27 são independentemente TAT, TAC, TCA, TCT, TCC, TCG, AGT, AGC, GGA, GGT, GGC, ou GGG

<220>
<221> misc_feature
<222> (28)..(30)
<223> N28 a N30 são independentemente TAT, TAC, TCA, TCT, TCC, TCG, AGT, AGC, GGA, GGT, GGC, ou GGG

<220>
<221> misc_feature
<222> (31)..(33)
<223> N31 a N33 são independentemente TAT, TAC, TCA, TCT, TCC, TCG, AGT, AGC, GGA, GGT, GGC, ou GGG

<220>
<221> misc_feature

<222> (34)..(36)
<223> N34 a N36 são independentemente TAT, TAC, TCA, TCT, TCC, TCG, AGT, AGC, GGA, GGT, GGC, ou GGG

<220>
<221> misc_feature
<222> (37)..(39)
<223> N37 a N39 são independentemente TAT, TAC, TCA, TCT, TCC, TCG, AGT, AGC, GGA, GGT, GGC, ou GGG

<220>
<221> misc_feature
<222> (40)..(42)
<223> N40 a N42 são independentemente TAT, TAC, TCA, TCT, TCC, TCG, AGT, AGC, GGA, GGT, GGC, ou GGG

<220>
<221> misc_feature
<222> (43)..(45)
<223> N43 a N45 são independentemente TAT, TAC, TCA, TCT, TCC, TCG, AGT, AGC, GGA, GGT, GGC, ou GGG

<220>
<221> misc_feature
<222> (46)..(48)
<223> N46 a N48 são independentemente TAT, TAC, TCA, TCT, TCC, TCG, AGT, AGC, GGA, GGT, GGC, ou GGG

<220>
<221> misc_feature
<222> (49)..(51)
<223> N49 a N51 são independentemente TAT, TAC, TCA, TCT, TCC, TCG, AGT, AGC, GGA, GGT, GGC, ou GGG

<220>
<221> misc_feature
<222> (52)..(54)
<223> N52 a N54 são independentemente TAT, TAC, TCA, TCT, TCC, TCG, AGT, AGC, GGA, GGT, GGC, ou GGG

<400> 41
gtctattatt gtgctcgcnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnngstwtk 60

gactactggg gtcaagga 78

<210> 42
<211> 81
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> H3-A13 sintético

<220>
<221> misc_feature
<222> (19)..(21)

<223> N19 a N21 são independentemente TAT, TAC, TCA, TCT, TCC, TCG, AGT, AGC, GGA, GGT, GGC, ou GGG

<220>
<221> misc_feature
<222> (22)..(24)
<223> N22 a N24 são independentemente TAT, TAC, TCA, TCT, TCC, TCG, AGT, AGC, GGA, GGT, GGC, ou GGG

<220>
<221> misc_feature
<222> (25)..(27)
<223> N25 a N27 são independentemente TAT, TAC, TCA, TCT, TCC, TCG, AGT, AGC, GGA, GGT, GGC, ou GGG

<220>
<221> misc_feature
<222> (28)..(30)
<223> N28 a N30 são independentemente TAT, TAC, TCA, TCT, TCC, TCG, AGT, AGC, GGA, GGT, GGC, ou GGG

<220>
<221> misc_feature
<222> (31)..(33)
<223> N31 a N33 são independentemente TAT, TAC, TCA, TCT, TCC, TCG, AGT, AGC, GGA, GGT, GGC, ou GGG

<220>
<221> misc_feature
<222> (34)..(36)
<223> N34 a N36 são independentemente TAT, TAC, TCA, TCT, TCC, TCG, AGT, AGC, GGA, GGT, GGC, ou GGG

<220>
<221> misc_feature
<222> (37)..(39)
<223> N37 a N39 são independentemente TAT, TAC, TCA, TCT, TCC, TCG, AGT, AGC, GGA, GGT, GGC, ou GGG

<220>
<221> misc_feature
<222> (40)..(42)
<223> N40 a N42 são independentemente TAT, TAC, TCA, TCT, TCC, TCG, AGT, AGC, GGA, GGT, GGC, ou GGG

<220>
<221> misc_feature
<222> (43)..(45)
<223> N43 a N45 são independentemente TAT, TAC, TCA, TCT, TCC, TCG, AGT, AGC, GGA, GGT, GGC, ou GGG

<220>
<221> misc_feature
<222> (46)..(48)
<223> N46 a N48 são independentemente TAT, TAC, TCA, TCT, TCC, TCG, AGT, AGC, GGA, GGT, GGC, ou GGG

<220>
<221> misc_feature
<222> (49)..(51)
<223> N49 a N51 são independentemente TAT, TAC, TCA, TCT, TCC, TCG, AGT, AGC, GGA, GGT, GGC, ou GGG

<220>
<221> misc_feature
<222> (52)..(54)
<223> N52 a N54 são independentemente TAT, TAC, TCA, TCT, TCC, TCG, AGT, AGC, GGA, GGT, GGC, ou GGG

<220>
<221> misc_feature
<222> (55)..(57)
<223> N55 a N57 são independentemente TAT, TAC, TCA, TCT, TCC, TCG, AGT, AGC, GGA, GGT, GGC, ou GGG

<400> 42
gtctattatt gtgctcgcnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnngst 60

wtkgactact ggggtcaagg a 81

<210> 43
<211> 84
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> H3-A14 sintético

<220>
<221> misc_feature
<222> (19)..(21)
<223> N19 a N21 são independentemente TAT, TAC, TCA, TCT, TCC, TCG, AGT, AGC, GGA, GGT, GGC, ou GGG

<220>
<221> misc_feature
<222> (22)..(24)
<223> N22 a N24 são independentemente TAT, TAC, TCA, TCT, TCC, TCG, AGT, AGC, GGA, GGT, GGC, ou GGG

<220>
<221> misc_feature
<222> (25)..(27)
<223> N25 a N27 são independentemente TAT, TAC, TCA, TCT, TCC, TCG, AGT, AGC, GGA, GGT, GGC, ou GGG

<220>
<221> misc_feature
<222> (28)..(30)
<223> N28 a N30 são independentemente TAT, TAC, TCA, TCT, TCC, TCG, AGT, AGC, GGA, GGT, GGC, ou GGG

<220>

<221> misc_feature
<222> (31)..(33)
<223> N31 a N33 são independentemente TAT, TAC, TCA, TCT, TCC, TCG, AGT, AGC, GGA, GGT, GGC, ou GGG

<220>
<221> misc_feature
<222> (34)..(36)
<223> N34 a N36 são independentemente TAT, TAC, TCA, TCT, TCC, TCG, AGT, AGC, GGA, GGT, GGC, ou GGG

<220>
<221> misc_feature
<222> (37)..(39)
<223> N37 a N39 são independentemente TAT, TAC, TCA, TCT, TCC, TCG, AGT, AGC, GGA, GGT, GGC, ou GGG

<220>
<221> misc_feature
<222> (40)..(42)
<223> N40 a N42 são independentemente TAT, TAC, TCA, TCT, TCC, TCG,AGT, AGC, GGA, GGT, GGC, ou GGG

<220>
<221> misc_feature
<222> (43)..(45)
<223> N43 a N45 são independentemente TAT, TAC, TCA, TCT, TCC, TCG, AGT, AGC, GGA, GGT, GGC, ou GGG

<220>
<221> misc_feature
<222> (46)..(48)
<223> N46 a N48 são independentemente TAT, TAC, TCA, TCT, TCC, TCG, AGT, AGC, GGA, GGT, GGC, ou GGG

<220>
<221> misc_feature
<222> (49)..(51)
<223> N49 a N51 são independentemente TAT, TAC, TCA, TCT, TCC, TCG, AGT, AGC, GGA, GGT, GGC, ou GGG

<220>
<221> misc_feature
<222> (52)..(54)
<223> N52 a N54 são independentemente TAT, TAC, TCA, TCT, TCC, TCG, AGT, AGC, GGA, GGT, GGC, ou GGG

<220>
<221> misc_feature
<222> (55)..(57)
<223> N55 a N57 são independentemente TAT, TAC, TCA, TCT, TCC, TCG, AGT, AGC, GGA, GGT, GGC, ou GGG

<220>
<221> misc_feature
<222> (58)..(60)

<223> N58 a N60 são independentemente TAT, TAC, TCA, TCT, TCC, TCG, AGT, AGC, GGA, GGT, GGC, ou GGG

<400> 43
gtctattatt gtgctcgcnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn 60

gstwtkgact actggggtca agga 84

<210> 44
<211> 87
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> H3-A15 sintético

<220>
<221> misc_feature
<222> (19)..(21)
<223> N19 a N21 são independentemente TAT, TAC, TCA, TCT, TCC, TCG, AGT, AGC, GGA, GGT, GGC, ou GGG

<220>
<221> misc_feature
<222> (22)..(24)
<223> N22 a N24 são independentemente TAT, TAC, TCA, TCT, TCC, TCG, AGT, AGC, GGA, GGT, GGC, ou GGG

<220>
<221> misc_feature
<222> (25)..(27)
<223> N25 a N27 são independentemente TAT, TAC, TCA, TCT, TCC, TCG, AGT, AGC, GGA, GGT, GGC, ou GGG

<220>
<221> misc_feature
<222> (28)..(30)
<223> N28 a N30 são independentemente TAT, TAC, TCA, TCT, TCC, TCG, AGT, AGC, GGA, GGT, GGC, ou GGG

<220>
<221> misc_feature
<222> (31)..(33)
<223> N31 a N33 são independentemente TAT, TAC, TCA, TCT, TCC, TCG, AGT, AGC, GGA, GGT, GGC, ou GGG

<220>
<221> misc_feature
<222> (34)..(36)
<223> N34 a N36 são independentemente TAT, TAC, TCA, TCT, TCC, TCG, AGT, AGC, GGA, GGT, GGC, ou GGG

<220>
<221> misc_feature
<222> (37)..(39)
<223> N37 a N39 são independentemente TAT, TAC, TCA, TCT, TCC,

TCG, AGT, AGC, GGA, GGT, GGC, ou GGG

<220>
<221> misc_feature
<222> (40)..(42)
<223> N40 a N42 são independentemente TAT, TAC, TCA, TCT, TCC, TCG, AGT, AGC, GGA, GGT, GGC, ou GGG

<220>
<221> misc_feature
<222> (43)..(45)
<223> N43 a N45 são independentemente TAT, TAC, TCA, TCT, TCC, TCG, AGT, AGC, GGA, GGT, GGC, ou GGG

<220>
<221> misc_feature
<222> (46)..(48)
<223> N46 a N48 são independentemente TAT, TAC, TCA, TCT, TCC, TCG, AGT, AGC, GGA, GGT, GGC, ou GGG

<220>
<221> misc_feature
<222> (49)..(51)
<223> N49 a N51 são independentemente TAT, TAC, TCA, TCT, TCC, TCG, AGT, AGC, GGA, GGT, GGC, ou GGG

<220>
<221> misc_feature
<222> (52)..(54)
<223> N52 a N54 são independentemente TAT, TAC, TCA, TCT, TCC, TCG, AGT, AGC, GGA, GGT, GGC, ou GGG

<220>
<221> misc_feature
<222> (55)..(57)
<223> N55 a N57 são independentemente TAT, TAC, TCA, TCT, TCC, TCG, AGT, AGC, GGA, GGT, GGC, ou GGG

<220>
<221> misc_feature
<222> (58)..(60)
<223> N58 a N60 são independentemente TAT, TAC, TCA, TCT, TCC, TCG, AGT, AGC, GGA, GGT, GGC, ou GGG

<220>
<221> misc_feature
<222> (61)..(63)
<223> N61 a N63 são independentemente TAT, TAC, TCA, TCT, TCC, TCG, AGT, AGC, GGA, GGT, GGC, ou GGG

<400> 44
gtctattatt gtgctcgcnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn 60

nnngstwtkg actactgggg tcaagga 87

<210> 45

<211> 90
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> H3-A16 sintético

<220>
<221> misc_feature
<222> (19)..(21)
<223> N19 a N21 são independentemente TAT, TAC, TCA, TCT, TCC, TCG, AGT, AGC, GGA, GGT, GGC, ou GGG

<220>
<221> misc_feature
<222> (22)..(24)
<223> N22 a N24 são independentemente TAT, TAC, TCA, TCT, TCC, TCG, AGT, AGC, GGA, GGT, GGC, ou GGG

<220>
<221> misc_feature
<222> (25)..(27)
<223> N25 a N27 são independentemente TAT, TAC, TCA, TCT, TCC, TCG, AGT, AGC, GGA, GGT, GGC, ou GGG

<220>
<221> misc_feature
<222> (28)..(30)
<223> N28 a N30 são independentemente TAT, TAC, TCA, TCT, TCC, TCG, AGT, AGC, GGA, GGT, GGC, ou GGG

<220>
<221> misc_feature
<222> (31)..(33)
<223> N31 a N33 são independentemente TAT, TAC, TCA, TCT, TCC, TCG, AGT, AGC, GGA, GGT, GGC, ou GGG

<220>
<221> misc_feature
<222> (34)..(36)
<223> N34 a N36 são independentemente TAT, TAC, TCA, TCT, TCC, TCG, AGT, AGC, GGA, GGT, GGC, ou GGG

<220>
<221> misc_feature
<222> (37)..(39)
<223> N37 a N39 são independentemente TAT, TAC, TCA, TCT, TCC, TCG, AGT, AGC, GGA, GGT, GGC, ou GGG

<220>
<221> misc_feature
<222> (40)..(42)
<223> N40 a N42 são independentemente TAT, TAC, TCA, TCT, TCC, TCG, AGT, AGC, GGA, GGT, GGC, ou GGG

<220>

<221> misc_feature
<222> (43)..(45)
<223> N43 a N45 são independentemente TAT, TAC, TCA, TCT, TCC, TCG, AGT, AGC, GGA, GGT, GGC, ou GGG

<220>
<221> misc_feature
<222> (46)..(48)
<223> N46 a N48 são independentemente TAT, TAC, TCA, TCT, TCC, TCG, AGT, AGC, GGA, GGT, GGC, ou GGG

<220>
<221> misc_feature
<222> (49)..(51)
<223> N49 a N51 são independentemente TAT, TAC, TCA, TCT, TCC, TCG, AGT, AGC, GGA, GGT, GGC, ou GGG

<220>
<221> misc_feature
<222> (52)..(54)
<223> N52 a N54 são independentemente TAT, TAC, TCA, TCT, TCC, TCG, AGT, AGC, GGA, GGT, GGC, ou GGG

<220>
<221> misc_feature
<222> (55)..(57)
<223> N55 a N57 são independentemente TAT, TAC, TCA, TCT, TCC, TCG, AGT, AGC, GGA, GGT, GGC, ou GGG

<220>
<221> misc_feature
<222> (58)..(60)
<223> N58 a N60 são independentemente TAT, TAC, TCA, TCT, TCC, TCG, AGT, AGC, GGA, GGT, GGC, ou GGG

<220>
<221> misc_feature
<222> (61)..(63)
<223> N61 a N63 são independentemente TAT, TAC, TCA, TCT, TCC, TCG, AGT, AGC, GGA, GGT, GGC, ou GGG

<220>
<221> misc_feature
<222> (64)..(66)
<223> N64 a N66 são independentemente TAT, TAC, TCA, TCT, TCC, TCG, AGT, AGC, GGA, GGT, GGC, ou GGG

<400> 45
gtctattatt gtgctcgcnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn 60

nnnnnngstw tkgactactg gggtcaagga 90

<210> 46
<211> 93
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> H3-A17 sintético

<220>
<221> misc_feature
<222> (19)..(21)
<223> N19 a N21 são independentemente TAT, TAC, TCA, TCT, TCC, TCG, AGT, AGC, GGA, GGT, GGC, ou GGG

<220>
<221> misc_feature
<222> (22)..(24)
<223> N22 a N24 são independentemente TAT, TAC, TCA, TCT, TCC, TCG, AGT, AGC, GGA, GGT, GGC, ou GGG

<220>
<221> misc_feature
<222> (25)..(27)
<223> N25 a N27 são independentemente TAT, TAC, TCA, TCT, TCC, TCG, AGT, AGC, GGA, GGT, GGC, ou GGG

<220>
<221> misc_feature
<222> (28)..(30)
<223> N28 to N30 are independently either TAT, TAC, TCA, TCT, TCC, TCG, AGT, AGC, GGA, GGT, GGC, or GGG

<220>
<221> misc_feature
<222> (31)..(33)
<223> N31 a N33 são independentemente TAT, TAC, TCA, TCT, TCC, TCG, AGT, AGC, GGA, GGT, GGC, ou GGG

<220>
<221> misc_feature
<222> (34)..(36)
<223> N34 a N36 são independentemente TAT, TAC, TCA, TCT, TCC, TCG, AGT, AGC, GGA, GGT, GGC, ou GGG

<220>
<221> misc_feature
<222> (37)..(39)
<223> N37 a N39 são independentemente TAT, TAC, TCA, TCT, TCC, TCG, AGT, AGC, GGA, GGT, GGC, ou GGG

<220>
<221> misc_feature
<222> (40)..(42)
<223> N40 a N42 são independentemente TAT, TAC, TCA, TCT, TCC, TCG, AGT, AGC, GGA, GGT, GGC, ou GGG

<220>
<221> misc_feature
<222> (43)..(45)
<223> N43 a N45 são independentemente TAT, TAC, TCA, TCT, TCC,

TCG, AGT, AGC, GGA, GGT, GGC, ou GGG

<220>
<221> misc_feature
<222> (46)..(48)
<223> N46 a N48 são independentemente TAT, TAC, TCA, TCT, TCC, TCG, AGT, AGC, GGA, GGT, GGC, ou GGG

<220>
<221> misc_feature
<222> (49)..(51)
<223> N49 a N51 são independentemente TAT, TAC, TCA, TCT, TCC, TCG, AGT, AGC, GGA, GGT, GGC, ou GGG

<220>
<221> misc_feature
<222> (52)..(54)
<223> N52 a N54 são independentemente TAT, TAC, TCA, TCT, TCC, TCG, AGT, AGC, GGA, GGT, GGC, ou GGG

<220>
<221> misc_feature
<222> (55)..(57)
<223> N55 a N57 são independentemente TAT, TAC, TCA, TCT, TCC, TCG, AGT, AGC, GGA, GGT, GGC, ou GGG

<220>
<221> misc_feature
<222> (58)..(60)
<223> N58 a N60 são independentemente TAT, TAC, TCA, TCT, TCC, TCG, AGT, AGC, GGA, GGT, GGC, ou GGG

<220>
<221> misc_feature
<222> (61)..(63)
<223> N61 a N63 são independentemente either TAT, TAC, TCA, TCT, TCC, TCG, AGT, AGC, GGA, GGT, GGC, ou GGG

<220>
<221> misc_feature
<222> (64)..(66)
<223> N64 a N66 são independentemente TAT, TAC, TCA, TCT, TCC, TCG, AGT, AGC, GGA, GGT, GGC, ou GGG

<220>
<221> misc_feature
<222> (67)..(69)
<223> N67 a N69 são independentemente TAT, TAC, TCA, TCT, TCC, TCG, AGT, AGC, GGA, GGT, GGC, ou GGG

<400> 46
gtctattatt gtgctcgcnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn 60

nnnnnnnnng stwtkgacta ctggggtcaa gga 93

<210> 47

<211> 60
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> H3-B6 sintético

<220>
<221> misc_feature
<222> (19)..(21)
<223> N19 a N21 são independentemente TAT, TAC, TCA, TCT, TCC, TCG, AGT, AGC, CGA, CGT, CGC, CGG, AGA, ou AGG

<220>
<221> misc_feature
<222> (22)..(24)
<223> N22 a N24 são independentemente TAT, TAC, TCA, TCT, TCC, TCG, AGT, AGC, CGA, CGT, CGC, CGG, AGA, ou AGG

<220>
<221> misc_feature
<222> (25)..(27)
<223> N25 a N27 são independentemente TAT, TAC, TCA, TCT, TCC, TCG, AGT, AGC, CGA, CGT, CGC, CGG, AGA, ou AGG

<220>
<221> misc_feature
<222> (28)..(30)
<223> N19 a N21 são independentemente TAT, TAC, TCA, TCT, TCC, TCG, AGT, AGC, CGA, CGT, CGC, CGG, AGA, ou AGG

<220>
<221> misc_feature
<222> (31)..(33)
<223> N31 a N33 são independentemente TAT, TAC, TCA, TCT, TCC, TCG, AGT, AGC, CGA, CGT, CGC, CGG, AGA, ou AGG

<220>
<221> misc_feature
<222> (34)..(36)
<223> N34 a N36 são independentemente TAT, TAC, TCA, TCT, TCC, TCG, AGT, AGC, CGA, CGT, CGC, CGG, AGA, ou AGG

<400> 47
gtctattatt gtgctcgcnn nnnnnnnnnn nnnnnngstw tkgactactg gggtcaagga 60

<210> 48
<211> 63
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> H3-B7 sintético

<220>
<221> misc_feature

<222> (19)..(21)
<223> N19 a N21 são independentemente TAT, TAC, TCA, TCT, TCC, TCG, AGT, AGC, CGA, CGT, CGC, CGG, AGA, ou AGG

<220>
<221> misc_feature
<222> (22)..(24)
<223> N22 a N24 são independentemente TAT, TAC, TCA, TCT, TCC, TCG, AGT, AGC, CGA, CGT, CGC, CGG, AGA, ou AGG

<220>
<221> misc_feature
<222> (25)..(27)
<223> N25 a N27 são independentemente TAT, TAC, TCA, TCT, TCC, TCG, AGT, AGC, CGA, CGT, CGC, CGG, AGA, ou AGG

<220>
<221> misc_feature
<222> (28)..(30)
<223> N28 a N30 são independentemente TAT, TAC, TCA, TCT, TCC, TCG, AGT, AGC, CGA, CGT, CGC, CGG, AGA, ou AGG

<220>
<221> misc_feature
<222> (31)..(33)
<223> N31 a N33 são independentemente TAT, TAC, TCA, TCT, TCC, TCG, AGT, AGC, CGA, CGT, CGC, CGG, AGA, ou AGG

<220>
<221> misc_feature
<222> (34)..(36)
<223> N34 a N36 são independentemente TAT, TAC, TCA, TCT, TCC, TCG, AGT, AGC, CGA, CGT, CGC, CGG, AGA, ou AGG

<220>
<221> misc_feature
<222> (37)..(39)
<223> N37 a N39 são independentemente TAT, TAC, TCA, TCT, TCC, TCG, AGT, AGC, CGA, CGT, CGC, CGG, AGA, ou AGG

<400> 48
gtctattatt gtgctcgcnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnng stwtkgacta ctggggtcaa 60

gga 63

<210> 49
<211> 66
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> H3-B8 sintético

<220>
<221> misc_feature
<222> (19)..(21)

<223> N19 a N21 são independentemente TAT, TAC, TCA, TCT, TCC, TCG, AGT, AGC, CGA, CGT, CGC, CGG, AGA, ou AGG

<220>
<221> misc_feature
<222> (22)..(24)
<223> N22 a N24 são independentemente TAT, TAC, TCA, TCT, TCC, TCG, AGT, AGC, CGA, CGT, CGC, CGG, AGA, ou AGG

<220>
<221> misc_feature
<222> (25)..(27)
<223> N25 a N27 são independentemente TAT, TAC, TCA, TCT, TCC, TCG, AGT, AGC, CGA, CGT, CGC, CGG, AGA, ou AGG

<220>
<221> misc_feature
<222> (28)..(30)
<223> N28 a N30 são independentemente TAT, TAC, TCA, TCT, TCC, TCG, AGT, AGC, CGA, CGT, CGC, CGG, AGA, ou AGG

<220>
<221> misc_feature
<222> (31)..(33)
<223> N31 a N33 são independentemente TAT, TAC, TCA, TCT, TCC, TCG, AGT, AGC, CGA, CGT, CGC, CGG, AGA, ou AGG

<220>
<221> misc_feature
<222> (34)..(36)
<223> N34 a N36 são independentemente TAT, TAC, TCA, TCT, TCC, TCG, AGT, AGC, CGA, CGT, CGC, CGG, AGA, ou AGG

<220>
<221> misc_feature
<222> (37)..(39)
<223> N37 a N39 são independentemente TAT, TAC, TCA, TCT, TCC, TCG, AGT, AGC, CGA, CGT, CGC, CGG, AGA, ou AGG

<220>
<221> misc_feature
<222> (40)..(42)
<223> N40 a N42 são independentemente TAT, TAC, TCA, TCT, TCC, TCG, AGT, AGC, CGA, CGT, CGC, CGG, AGA, ou AGG

<400> 49
gtctattatt gtgctcgcnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nngstwtkga ctactggggt 60

caagga 66

<210> 50
<211> 69
<212> DNA
<213> Artificial

<220>

<223> H3-B9 sintético

<220>
<221> misc_feature
<222> (19)..(21)
<223> N19 a N21 são independentemente TAT, TAC, TCA, TCT, TCC, TCG, AGT, AGC, CGA, CGT, CGC, CGG, AGA, ou AGG

<220>
<221> misc_feature
<222> (22)..(24)
<223> N22 a N24 são independentemente TAT, TAC, TCA, TCT, TCC, TCG, AGT, AGC, CGA, CGT, CGC, CGG, AGA, ou AGG

<220>
<221> misc_feature
<222> (25)..(27)
<223> N19 a N21 são independentemente TAT, TAC, TCA, TCT, TCC, TCG, AGT, AGC, CGA, CGT, CGC, CGG, AGA, ou AGG

<220>
<221> misc_feature
<222> (28)..(30)
<223> N28 a N30 são independentemente TAT, TAC, TCA, TCT, TCC, TCG, AGT, AGC, CGA, CGT, CGC, CGG, AGA, ou AGG

<220>
<221> misc_feature
<222> (31)..(33)
<223> N31 a N33 são independentemente TAT, TAC, TCA, TCT, TCC, TCG, AGT, AGC, CGA, CGT, CGC, CGG, AGA, ou AGG

<220>
<221> misc_feature
<222> (34)..(36)
<223> N34 a N36 são independentemente TAT, TAC, TCA, TCT, TCC, TCG, AGT, AGC, CGA, CGT, CGC, CGG, AGA, ou AGG

<220>
<221> misc_feature
<222> (37)..(39)
<223> N37 a N39 são independentemente TAT, TAC, TCA, TCT, TCC, TCG, AGT, AGC, CGA, CGT, CGC, CGG, AGA, ou AGG

<220>
<221> misc_feature
<222> (40)..(42)
<223> N40 a N42 são independentemente TAT, TAC, TCA, TCT, TCC, TCG, AGT, AGC, CGA, CGT, CGC, CGG, AGA, ou AGG

<220>
<221> misc_feature
<222> (43)..(45)
<223> N43 a N45 são independentemente TAT, TAC, TCA, TCT, TCC, TCG, AGT, AGC, CGA, CGT, CGC, CGG, AGA, ou AGG

<400> 50
gtctattatt gtgctcgcnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnngstwt kgactactgg 60

ggtcaagga 69

<210> 51
<211> 72
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> H3-B10 sintético

<220>
<221> misc_feature
<222> (19)..(21)
<223> N19 a N21 são independentemente TAT, TAC, TCA, TCT, TCC, TCG, AGT, AGC, CGA, CGT, CGC, CGG, AGA, ou AGG

<220>
<221> misc_feature
<222> (22)..(24)
<223> N22 a N24 são independentemente TAT, TAC, TCA, TCT, TCC, TCG, AGT, AGC, CGA, CGT, CGC, CGG, AGA, ou AGG

<220>
<221> misc_feature
<222> (25)..(27)
<223> N25 a N27 são independentemente TAT, TAC, TCA, TCT, TCC, TCG, AGT, AGC, CGA, CGT, CGC, CGG, AGA, ou AGG

<220>
<221> misc_feature
<222> (28)..(30)
<223> N28 a N30 são independentemente TAT, TAC, TCA, TCT, TCC, TCG, AGT, AGC, CGA, CGT, CGC, CGG, AGA, ou AGG

<220>
<221> misc_feature
<222> (31)..(33)
<223> N31 a N33 são independentemente TAT, TAC, TCA, TCT, TCC, TCG, AGT, AGC, CGA, CGT, CGC, CGG, AGA, ou AGG

<220>
<221> misc_feature
<222> (34)..(36)
<223> N34 a N36 são independentemente TAT, TAC, TCA, TCT, TCC, TCG, AGT, AGC, CGA, CGT, CGC, CGG, AGA, ou AGG

<220>
<221> misc_feature
<222> (37)..(39)
<223> N37 a N39 são independentemente TAT, TAC, TCA, TCT, TCC, TCG, AGT, AGC, CGA, CGT, CGC, CGG, AGA, ou AGG

<220>

<221> misc_feature
<222> (40)..(42)
<223> N40 a N42 são independentemente TAT, TAC, TCA, TCT, TCC, TCG, AGT, AGC, CGA, CGT, CGC, CGG, AGA, ou AGG

<220>
<221> misc_feature
<222> (43)..(45)
<223> N43 a N45 são independentemente TAT, TAC, TCA, TCT, TCC, TCG, AGT, AGC, CGA, CGT, CGC, CGG, AGA, ou AGG

<220>
<221> misc_feature
<222> (46)..(48)
<223> N46 a N48 são independentemente TAT, TAC, TCA, TCT, TCC, TCG, AGT, AGC, CGA, CGT, CGC, CGG, AGA, ou AGG

<400> 51
gtctattatt gtgctcgcnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnngs twtkgactac 60

tggggtcaag ga 72

<210> 52
<211> 75
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> H3-B11 sintético

<220>
<221> misc_feature
<222> (19)..(21)
<223> N19 a N21 são independentemente TAT, TAC, TCA, TCT, TCC, TCG, AGT, AGC, CGA, CGT, CGC, CGG, AGA, ou AGG

<220>
<221> misc_feature
<222> (22)..(24)
<223> N22 a N24 são independentemente TAT, TAC, TCA, TCT, TCC, TCG, AGT, AGC, CGA, CGT, CGC, CGG, AGA, ou AGG

<220>
<221> misc_feature
<222> (25)..(27)
<223> N25 a N27 são independentemente TAT, TAC, TCA, TCT, TCC, TCG, AGT, AGC, CGA, CGT, CGC, CGG, AGA, ou AGG

<220>
<221> misc_feature
<222> (28)..(30)
<223> N28 a N30 são independentemente TAT, TAC, TCA, TCT, TCC, TCG, AGT, AGC, CGA, CGT, CGC, CGG, AGA, ou AGG

<220>
<221> misc_feature

<222> (31)..(33)
<223> N31 a N33 são independentemente TAT, TAC, TCA, TCT, TCC, TCG, AGT, AGC, CGA, CGT, CGC, CGG, AGA, ou AGG

<220>
<221> misc_feature
<222> (34)..(36)
<223> N34 a N36 são independentemente TAT, TAC, TCA, TCT, TCC, TCG, AGT, AGC, CGA, CGT, CGC, CGG, AGA, ou AGG

<220>
<221> misc_feature
<222> (37)..(39)
<223> N37 a N39 são independentemente TAT, TAC, TCA, TCT, TCC, TCG, AGT, AGC, CGA, CGT, CGC, CGG, AGA, ou AGG

<220>
<221> misc_feature
<222> (40)..(42)
<223> N40 a N42 são independentemente TAT, TAC, TCA, TCT, TCC, TCG, AGT, AGC, CGA, CGT, CGC, CGG, AGA, ou AGG

<220>
<221> misc_feature
<222> (43)..(45)
<223> N43 a N45 são independentemente TAT, TAC, TCA, TCT, TCC, TCG, AGT, AGC, CGA, CGT, CGC, CGG, AGA, ou AGG

<220>
<221> misc_feature
<222> (46)..(48)
<223> N46 a N48 são independentemente TAT, TAC, TCA, TCT, TCC, TCG, AGT, AGC, CGA, CGT, CGC, CGG, AGA, ou AGG

<220>
<221> misc_feature
<222> (49)..(51)
<223> N49 a N51 são independentemente TAT, TAC, TCA, TCT, TCC, TCG, AGT, AGC, CGA, CGT, CGC, CGG, AGA, ou AGG

<400> 52
gtctattatt gtgctcgcnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn ngstwtkgac 60

tactggggtc aagga 75

<210> 53
<211> 78
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> H3-B12 sintético

<220>
<221> misc_feature
<222> (19)..(21)

<223> N19 a N21 são independentemente TAT, TAC, TCA, TCT, TCC, TCG, AGT, AGC, CGA, CGT, CGC, CGG, AGA, ou AGG

<220>
<221> misc_feature
<222> (22)..(24)
<223> N22 a N24 são independentemente TAT, TAC, TCA, TCT, TCC, TCG, AGT, AGC, CGA, CGT, CGC, CGG, AGA, ou AGG

<220>
<221> misc_feature
<222> (25)..(27)
<223> N25 a N27 são independentemente TAT, TAC, TCA, TCT, TCC, TCG, AGT, AGC, CGA, CGT, CGC, CGG, AGA, ou AGG

<220>
<221> misc_feature
<222> (28)..(30)
<223> N28 a N30 são independentemente TAT, TAC, TCA, TCT, TCC, TCG, AGT, AGC, CGA, CGT, CGC, CGG, AGA, ou AGG

<220>
<221> misc_feature
<222> (31)..(33)
<223> N31 a N33 são independentemente TAT, TAC, TCA, TCT, TCC, TCG, AGT, AGC, CGA, CGT, CGC, CGG, AGA, ou AGG

<220>
<221> misc_feature
<222> (34)..(36)
<223> N34 a N36 são independentemente TAT, TAC, TCA, TCT, TCC, TCG, AGT, AGC, CGA, CGT, CGC, CGG, AGA, ou AGG

<220>
<221> misc_feature
<222> (37)..(39)
<223> N37 a N39 são independentemente TAT, TAC, TCA, TCT, TCC, TCG, AGT, AGC, CGA, CGT, CGC, CGG, AGA, ou AGG

<220>
<221> misc_feature
<222> (40)..(42)
<223> N40 a N42 são independentemente TAT, TAC, TCA, TCT, TCC, TCG, AGT, AGC, CGA, CGT, CGC, CGG, AGA, ou AGG

<220>
<221> misc_feature
<222> (43)..(45)
<223> N43 a N45 são independentemente TAT, TAC, TCA, TCT, TCC, TCG, AGT, AGC, CGA, CGT, CGC, CGG, AGA, ou AGG

<220>
<221> misc_feature
<222> (46)..(48)
<223> N46 a N48 são independentemente TAT, TAC, TCA, TCT, TCC, TCG, AGT, AGC, CGA, CGT, CGC, CGG, AGA, ou AGG

<220>
<221> misc_feature
<222> (49)..(51)
<223> N49 a N51 são independentemente TAT, TAC, TCA, TCT, TCC, TCG, AGT, AGC, CGA, CGT, CGC, CGG, AGA, ou AGG

<220>
<221> misc_feature
<222> (52)..(54)
<223> N52 a N54 são independentemente TAT, TAC, TCA, TCT, TCC, TCG, AGT, AGC, CGA, CGT, CGC, CGG, AGA, ou AGG

<400> 53
gtctattatt gtgctcgcnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnngstwtk 60

gactactggg gtcaagga 78

<210> 54
<211> 81
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> H3-B13 sintético

<220>
<221> misc_feature
<222> (19)..(21)
<223> N19 a N21 são independentemente TAT, TAC, TCA, TCT, TCC, TCG, AGT, AGC, CGA, CGT, CGC, CGG, AGA, ou AGG

<220>
<221> misc_feature
<222> (22)..(24)
<223> N22 a N24 são independentemente TAT, TAC, TCA, TCT, TCC, TCG, AGT, AGC, CGA, CGT, CGC, CGG, AGA, ou AGG

<220>
<221> misc_feature
<222> (25)..(27)
<223> N25 a N27 são independentemente TAT, TAC, TCA, TCT, TCC, TCG, AGT, AGC, CGA, CGT, CGC, CGG, AGA, ou AGG

<220>
<221> misc_feature
<222> (28)..(30)
<223> N28 a N30 são independentemente TAT, TAC, TCA, TCT, TCC, TCG, AGT, AGC, CGA, CGT, CGC, CGG, AGA, ou AGG

<220>
<221> misc_feature
<222> (31)..(33)
<223> N31 a N33 são independentemente TAT, TAC, TCA, TCT, TCC, TCG, AGT, AGC, CGA, CGT, CGC, CGG, AGA, ou AGG

<220>

<221> misc_feature
<222> (34)..(36)
<223> N34 a N36 são independentemente TAT, TAC, TCA, TCT, TCC, TCG, AGT, AGC, CGA, CGT, CGC, CGG, AGA, ou AGG

<220>
<221> misc_feature
<222> (37)..(39)
<223> N37 a N39 são independentemente TAT, TAC, TCA, TCT, TCC, TCG, AGT, AGC, CGA, CGT, CGC, CGG, AGA, ou AGG

<220>
<221> misc_feature
<222> (40)..(42)
<223> N40 a N42 são independentemente TAT, TAC, TCA, TCT, TCC, TCG, AGT, AGC, CGA, CGT, CGC, CGG, AGA, ou AGG

<220>
<221> misc_feature
<222> (43)..(45)
<223> N43 a N45 são independentemente TAT, TAC, TCA, TCT, TCC, TCG, AGT, AGC, CGA, CGT, CGC, CGG, AGA, ou AGG

<220>
<221> misc_feature
<222> (46)..(48)
<223> N46 a N48 são independentemente TAT, TAC, TCA, TCT, TCC, TCG, AGT, AGC, CGA, CGT, CGC, CGG, AGA, ou AGG

<220>
<221> misc_feature
<222> (49)..(51)
<223> N49 a N51 são independentemente TAT, TAC, TCA, TCT, TCC, TCG, AGT, AGC, CGA, CGT, CGC, CGG, AGA, ou AGG

<220>
<221> misc_feature
<222> (52)..(54)
<223> N52 a N54 são independentemente TAT, TAC, TCA, TCT, TCC, TCG, AGT, AGC, CGA, CGT, CGC, CGG, AGA, ou AGG

<220>
<221> misc_feature
<222> (55)..(57)
<223> N55 a N57 são independentemente TAT, TAC, TCA, TCT, TCC, TCG, AGT, AGC, CGA, CGT, CGC, CGG, AGA, ou AGG

<400> 54
gtctattatt gtgctcgcnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnngst 60

wtkgactact ggggtcaagg a 81

<210> 55
<211> 84
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> synthetic H3-B14 sintético

<220>
<221> misc_feature
<222> (19)..(21)
<223> N19 a N21 são independentemente TAT, TAC, TCA, TCT, TCC, TCG, AGT, AGC, CGA, CGT, CGC, CGG, AGA, ou AGG

<220>
<221> misc_feature
<222> (22)..(24)
<223> N22 a N24 são independentemente TAT, TAC, TCA, TCT, TCC, TCG, AGT, AGC, CGA, CGT, CGC, CGG, AGA, ou AGG

<220>
<221> misc_feature
<222> (25)..(27)
<223> N25 a N27 são independentemente TAT, TAC, TCA, TCT, TCC, TCG, AGT, AGC, CGA, CGT, CGC, CGG, AGA, ou AGG

<220>
<221> misc_feature
<222> (28)..(30)
<223> N28 a N30 são independentemente TAT, TAC, TCA, TCT, TCC, TCG, AGT, AGC, CGA, CGT, CGC, CGG, AGA, ou AGG

<220>
<221> misc_feature
<222> (31)..(33)
<223> N31 a N33 são independentemente TAT, TAC, TCA, TCT, TCC, TCG, AGT, AGC, CGA, CGT, CGC, CGG, AGA, ou AGG

<220>
<221> misc_feature
<222> (34)..(36)
<223> N34 a N36 são independentemente TAT, TAC, TCA, TCT, TCC, TCG, AGT, AGC, CGA, CGT, CGC, CGG, AGA, ou AGG

<220>
<221> misc_feature
<222> (37)..(39)
<223> N37 a N39 são independentemente TAT, TAC, TCA, TCT, TCC, TCG, AGT, AGC, CGA, CGT, CGC, CGG, AGA, ou AGG

<220>
<221> misc_feature
<222> (40)..(42)
<223> N40 a N42 são independentemente TAT, TAC, TCA, TCT, TCC, TCG, AGT, AGC, CGA, CGT, CGC, CGG, AGA, ou AGG

<220>
<221> misc_feature
<222> (43)..(45)
<223> N43 a N45 são independentemente TAT, TAC, TCA, TCT, TCC,

TCG, AGT, AGC, CGA, CGT, CGC, CGG, AGA, ou AGG

<220>
<221> misc_feature
<222> (46)..(48)
<223> N46 a N48 são independentemente TAT, TAC, TCA, TCT, TCC, TCG, AGT, AGC, CGA, CGT, CGC, CGG, AGA, ou AGG

<220>
<221> misc_feature
<222> (49)..(51)
<223> N49 a N51 são independentemente TAT, TAC, TCA, TCT, TCC, TCG, AGT, AGC, CGA, CGT, CGC, CGG, AGA, ou AGG

<220>
<221> misc_feature
<222> (52)..(54)
<223> N52 a N54 são independentemente TAT, TAC, TCA, TCT, TCC, TCG, AGT, AGC, CGA, CGT, CGC, CGG, AGA, ou AGG

<220>
<221> misc_feature
<222> (55)..(57)
<223> N55 a N57 são independentemente TAT, TAC, TCA, TCT, TCC, TCG, AGT, AGC, CGA, CGT, CGC, CGG, AGA, ou AGG

<220>
<221> misc_feature
<222> (58)..(60)
<223> N58 a N60 são independentemente TAT, TAC, TCA, TCT, TCC, TCG, AGT, AGC, CGA, CGT, CGC, CGG, AGA, ou AGG

<400> 55
gtctattatt gtgctcgcnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn 60

gstwtkgact actggggtca agga 84

<210> 56
<211> 87
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> H3-B15 sintético

<220>
<221> misc_feature
<222> (19)..(21)
<223> N19 a N21 são independentemente TAT, TAC, TCA, TCT, TCC, TCG, AGT, AGC, CGA, CGT, CGC, CGG, AGA, ou AGG

<220>
<221> misc_feature
<222> (22)..(24)
<223> N22 a N24 são independentemente TAT, TAC, TCA, TCT, TCC, TCG, AGT, AGC, CGA, CGT, CGC, CGG, AGA, ou AGG

<220>
<221> misc_feature
<222> (25)..(27)
<223> N25 a N27 são independentemente TAT, TAC, TCA, TCT, TCC, TCG, AGT, AGC, CGA, CGT, CGC, CGG, AGA, ou AGG

<220>
<221> misc_feature
<222> (28)..(30)
<223> N28 a N30 são independentemente TAT, TAC, TCA, TCT, TCC, TCG, AGT, AGC, CGA, CGT, CGC, CGG, AGA, ou AGG

<220>
<221> misc_feature
<222> (31)..(33)
<223> N31 a N33 são independentemente TAT, TAC, TCA, TCT, TCC, TCG, AGT, AGC, CGA, CGT, CGC, CGG, AGA, ou AGG

<220>
<221> misc_feature
<222> (34)..(36)
<223> N34 a N36 são independentemente TAT, TAC, TCA, TCT, TCC, TCG, AGT, AGC, CGA, CGT, CGC, CGG, AGA, ou AGG

<220>
<221> misc_feature
<222> (37)..(39)
<223> N37 a N39 são independentemente TAT, TAC, TCA, TCT, TCC, TCG, AGT, AGC, CGA, CGT, CGC, CGG, AGA, ou AGG

<220>
<221> misc_feature
<222> (40)..(42)
<223> N40 a N42 são independentemente TAT, TAC, TCA, TCT, TCC, TCG, AGT, AGC, CGA, CGT, CGC, CGG, AGA, ou AGG

<220>
<221> misc_feature
<222> (43)..(45)
<223> N43 a N45 são independentemente TAT, TAC, TCA, TCT, TCC, TCG, AGT, AGC, CGA, CGT, CGC, CGG, AGA, ou AGG

<220>
<221> misc_feature
<222> (46)..(48)
<223> N46 a N48 são independentemente TAT, TAC, TCA, TCT, TCC, TCG, AGT, AGC, CGA, CGT, CGC, CGG, AGA, ou AGG

<220>
<221> misc_feature
<222> (49)..(51)
<223> N49 a N51 são independentemente TAT, TAC, TCA, TCT, TCC, TCG, AGT, AGC, CGA, CGT, CGC, CGG, AGA, ou AGG

<220>
<221> misc_feature

<222> (52)..(54)
<223> N52 a N54 são independentemente TAT, TAC, TCA, TCT, TCC, TCG, AGT, AGC, CGA, CGT, CGC, CGG, AGA, ou AGG

<220>
<221> misc_feature
<222> (55)..(57)
<223> N55 a N57 são independentemente TAT, TAC, TCA, TCT, TCC, TCG, AGT, AGC, CGA, CGT, CGC, CGG, AGA, ou AGG

<220>
<221> misc_feature
<222> (58)..(60)
<223> N58 a N60 são independentemente TAT, TAC, TCA, TCT, TCC, TCG, AGT, AGC, CGA, CGT, CGC, CGG, AGA, ou AGG

<220>
<221> misc_feature
<222> (61)..(63)
<223> N61 a N63 são independentemente TAT, TAC, TCA, TCT, TCC, TCG, AGT, AGC, CGA, CGT, CGC, CGG, AGA, ou AGG

<400> 56
gtctattatt gtgctcgcnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn 60

nnngstwtkg actactgggg tcaagga 87

<210> 57
<211> 90
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> synthetic H3-B16

<220>
<221> misc_feature
<222> (19)..(21)
<223> N19 a N21 são independentemente TAT, TAC, TCA, TCT, TCC, TCG, AGT, AGC, CGA, CGT, CGC, CGG, AGA, ou AGG

<220>
<221> misc_feature
<222> (22)..(24)
<223> N22 a N24 são independentemente TAT, TAC, TCA, TCT, TCC, TCG, AGT, AGC, CGA, CGT, CGC, CGG, AGA, ou AGG

<220>
<221> misc_feature
<222> (25)..(27)
<223> N25 a N27 são independentemente TAT, TAC, TCA, TCT, TCC, TCG, AGT, AGC, CGA, CGT, CGC, CGG, AGA, ou AGG

<220>
<221> misc_feature
<222> (28)..(30)

<223> N28 a N30 são independentemente TAT, TAC, TCA, TCT, TCC, TCG, AGT, AGC, CGA, CGT, CGC, CGG, AGA, ou AGG

<220>
<221> misc_feature
<222> (31)..(33)
<223> N31 a N33 são independentemente TAT, TAC, TCA, TCT, TCC, TCG, AGT, AGC, CGA, CGT, CGC, CGG, AGA, ou AGG

<220>
<221> misc_feature
<222> (34)..(36)
<223> N34 a N36 são independentemente TAT, TAC, TCA, TCT, TCC, TCG, AGT, AGC, CGA, CGT, CGC, CGG, AGA, ou AGG

<220>
<221> misc_feature
<222> (37)..(39)
<223> N37 a N39 são independentemente TAT, TAC, TCA, TCT, TCC, TCG, AGT, AGC, CGA, CGT, CGC, CGG, AGA, ou AGG

<220>
<221> misc_feature
<222> (40)..(42)
<223> N40 a N42 são independentemente TAT, TAC, TCA, TCT, TCC, TCG, AGT, AGC, CGA, CGT, CGC, CGG, AGA, ou AGG

<220>
<221> misc_feature
<222> (43)..(45)
<223> N43 a N45 são independentemente TAT, TAC, TCA, TCT, TCC, TCG, AGT, AGC, CGA, CGT, CGC, CGG, AGA, ou AGG

<220>
<221> misc_feature
<222> (46)..(48)
<223> N46 a N48 são independentemente TAT, TAC, TCA, TCT, TCC, TCG, AGT, AGC, CGA, CGT, CGC, CGG, AGA, ou AGG

<220>
<221> misc_feature
<222> (49)..(51)
<223> N49 a N51 são independentemente TAT, TAC, TCA, TCT, TCC, TCG, AGT, AGC, CGA, CGT, CGC, CGG, AGA, ou AGG

<220>
<221> misc_feature
<222> (52)..(54)
<223> N52 a N54 são independentemente TAT, TAC, TCA, TCT, TCC, TCG, AGT, AGC, CGA, CGT, CGC, CGG, AGA, ou AGG

<220>
<221> misc_feature
<222> (55)..(57)
<223> N55 a N57 são independentemente TAT, TAC, TCA, TCT, TCC, TCG, AGT, AGC, CGA, CGT, CGC, CGG, AGA, ou AGG

<220>
<221> misc_feature
<222> (58)..(60)
<223> N58 a N60 são independentemente TAT, TAC, TCA, TCT, TCC, TCG, AGT, AGC, CGA, CGT, CGC, CGG, AGA, ou AGG

<220>
<221> misc_feature
<222> (61)..(63)
<223> N61 a N63 são independentemente TAT, TAC, TCA, TCT, TCC, TCG, AGT, AGC, CGA, CGT, CGC, CGG, AGA, ou AGG

<220>
<221> misc_feature
<222> (64)..(66)
<223> N64 a N66 são independentemente TAT, TAC, TCA, TCT, TCC, TCG, AGT, AGC, CGA, CGT, CGC, CGG, AGA, ou AGG

<400> 57
gtctattatt gtgctcgcnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn 60

nnnnnngstw tkgactactg gggtcaagga 90

<210> 58
<211> 93
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> H3-B17 sintético

<220>
<221> misc_feature
<222> (19)..(21)
<223> N19 a N21 são independentemente TAT, TAC, TCA, TCT, TCC, TCG, AGT, AGC, CGA, CGT, CGC, CGG, AGA, ou AGG

<220>
<221> misc_feature
<222> (22)..(24)
<223> N22 a N24 são independentemente TAT, TAC, TCA, TCT, TCC, TCG, AGT, AGC, CGA, CGT, CGC, CGG, AGA, ou AGG

<220>
<221> misc_feature
<222> (25)..(27)
<223> N25 a N27 são independentemente TAT, TAC, TCA, TCT, TCC, TCG, AGT, AGC, CGA, CGT, CGC, CGG, AGA, ou AGG

<220>
<221> misc_feature
<222> (28)..(30)
<223> N28 a N30 são independentemente TAT, TAC, TCA, TCT, TCC, TCG, AGT, AGC, CGA, CGT, CGC, CGG, AGA, ou AGG

<220>

<221> misc_feature
<222> (31)..(33)
<223> N31 a N33 são independentemente TAT, TAC, TCA, TCT, TCC, TCG, AGT, AGC, CGA, CGT, CGC, CGG, AGA, ou AGG

<220>
<221> misc_feature
<222> (34)..(36)
<223> N34 a N36 são independentemente TAT, TAC, TCA, TCT, TCC, TCG, AGT, AGC, CGA, CGT, CGC, CGG, AGA, ou AGG

<220>
<221> misc_feature
<222> (37)..(39)
<223> N37 a N39 são independentemente TAT, TAC, TCA, TCT, TCC, TCG, AGT, AGC, CGA, CGT, CGC, CGG, AGA, ou AGG

<220>
<221> misc_feature
<222> (40)..(42)
<223> N40 a N42 são independentemente TAT, TAC, TCA, TCT, TCC, TCG, AGT, AGC, CGA, CGT, CGC, CGG, AGA, ou AGG

<220>
<221> misc_feature
<222> (43)..(45)
<223> N43 a N45 são independentemente TAT, TAC, TCA, TCT, TCC, TCG, AGT, AGC, CGA, CGT, CGC, CGG, AGA, ou AGG

<220>
<221> misc_feature
<222> (46)..(48)
<223> N46 a N48 são independentemente TAT, TAC, TCA, TCT, TCC, TCG, AGT, AGC, CGA, CGT, CGC, CGG, AGA, ou AGG

<220>
<221> misc_feature
<222> (49)..(51)
<223> N49 a N51 são independentemente TAT, TAC, TCA, TCT, TCC, TCG, AGT, AGC, CGA, CGT, CGC, CGG, AGA, ou AGG

<220>
<221> misc_feature
<222> (52)..(54)
<223> N52 a N54 são independentemente TAT, TAC, TCA, TCT, TCC, TCG, AGT, AGC, CGA, CGT, CGC, CGG, AGA, ou AGG

<220>
<221> misc_feature
<222> (55)..(57)
<223> N55 a N57 são independentemente TAT, TAC, TCA, TCT, TCC, TCG, AGT, AGC, CGA, CGT, CGC, CGG, AGA, ou AGG

<220>
<221> misc_feature
<222> (58)..(60)

<223> N58 a N60 são independentemente TAT, TAC, TCA, TCT, TCC, TCG, AGT, AGC, CGA, CGT, CGC, CGG, AGA, ou AGG

<220>
<221> misc_feature
<222> (61)..(63)
<223> N61 a N63 são independentemente TAT, TAC, TCA, TCT, TCC, TCG, AGT, AGC, CGA, CGT, CGC, CGG, AGA, ou AGG

<220>
<221> misc_feature
<222> (64)..(66)
<223> N64 a N66 são independentemente TAT, TAC, TCA, TCT, TCC, TCG, AGT, AGC, CGA, CGT, CGC, CGG, AGA, ou AGG

<220>
<221> misc_feature
<222> (67)..(69)
<223> N67 a N69 são independentemente TAT, TAC, TCA, TCT, TCC, TCG, AGT, AGC, CGA, CGT, CGC, CGG, AGA, ou AGG

<400> 58
gtctattatt gtgctcgcnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn 60

nnnnnnnnng stwtkgacta ctggggtcaa gga 93

<210> 59
<211> 60
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> H3-C6 sintético

<220>
<221> misc_feature
<222> (19)..(21)
<223> N19 a N21 são independentemente TAT, TAC, TCA, TCT, TCC, TCG, GGA, GGT, GGC, GGG, AGT, AGC, CGA, CGT, CGC, CGG, AGA, ou AGG

<220>
<221> misc_feature
<222> (22)..(24)
<223> N22 a N24 são independentemente TAT, TAC, TCA, TCT, TCC, TCG, GGA, GGT, GGC, GGG, AGT, AGC, CGA, CGT, CGC, CGG, AGA, ou AGG

<220>
<221> misc_feature
<222> (25)..(27)
<223> N25 a N27 são independentemente TAT, TAC, TCA, TCT, TCC, TCG, GGA, GGT, GGC, GGG, AGT, AGC, CGA, CGT, CGC, CGG, AGA, ou AGG

<220>

<221> misc_feature
<222> (28)..(30)
<223> N28 a N30 são independentemente TAT, TAC, TCA, TCT, TCC, TCG, GGA, GGT, GGC, GGG, AGT, AGC, CGA, CGT, CGC, CGG, AGA, ou AGG

<220>
<221> misc_feature
<222> (31)..(33)
<223> N31 a N33 são independentemente TAT, TAC, TCA, TCT, TCC, TCG, GGA, GGT, GGC, GGG, AGT, AGC, CGA, CGT, CGC, CGG, AGA, ou AGG

<220>
<221> misc_feature
<222> (34)..(36)
<223> N34 a N36 são independentemente TAT, TAC, TCA, TCT, TCC, TCG, GGA, GGT, GGC, GGG, AGT, AGC, CGA, CGT, CGC, CGG, AGA, ou AGG

<400> 59
gtctattatt gtgctcgcnn nnnnnnnnnn nnnnnngstw tkgactactg gggtcaagga 60

<210> 60
<211> 63
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> H3-C7 sintético

<220>
<221> misc_feature
<222> (19)..(21)
<223> N19 a N21 são independentemente TAT, TAC, TCA, TCT, TCC, TCG, GGA, GGT, GGC, GGG, AGT, AGC, CGA, CGT, CGC, CGG, AGA, ou AGG

<220>
<221> misc_feature
<222> (22)..(24)
<223> N22 a N24 são independentemente TAT, TAC, TCA, TCT, TCC, TCG, GGA, GGT, GGC, GGG, AGT, AGC, CGA, CGT, CGC, CGG, AGA, ou AGG

<220>
<221> misc_feature
<222> (25)..(27)
<223> N25 a N27 são independentemente TAT, TAC, TCA, TCT, TCC, TCG, GGA, GGT, GGC, GGG, AGT, AGC, CGA, CGT, CGC, CGG, AGA, ou AGG

<220>
<221> misc_feature
<222> (28)..(30)
<223> N28 a N30 são independentemente TAT, TAC, TCA, TCT, TCC,

TCG, GGA, GGT, GGC, GGG, AGT, AGC, CGA, CGT, CGC, CGG, AGA,
ou AGG

<220>
<221> misc_feature
<222> (31)..(33)
<223> N31 a N33 são independentemente TAT, TAC, TCA, TCT, TCC,
TCG, GGA, GGT, GGC, GGG, AGT, AGC, CGA, CGT, CGC, CGG, AGA,
ou AGG

<220>
<221> misc_feature
<222> (34)..(36)
<223> N34 a N36 são independentemente TAT, TAC, TCA, TCT, TCC,
TCG, GGA, GGT, GGC, GGG, AGT, AGC, CGA, CGT, CGC, CGG, AGA,
ou AGG

<220>
<221> misc_feature
<222> (37)..(39)
<223> N37 a N39 são independentemente TAT, TAC, TCA, TCT, TCC,
TCG, GGA, GGT, GGC, GGG, AGT, AGC, CGA, CGT, CGC, CGG, AGA,
ou AGG

<400> 60
gtctattatt gtgctcgcnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnng stwtkgacta ctggggtcaa 60

gga 63

<210> 61
<211> 66
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> H3-C8 sintético

<220>
<221> misc_feature
<222> (19)..(21)
<223> N19 a N21 são independentemente TAT, TAC, TCA, TCT, TCC,
TCG, GGA, GGT, GGC, GGG, AGT, AGC, CGA, CGT, CGC, CGG, AGA,
ou AGG

<220>
<221> misc_feature
<222> (22)..(24)
<223> N22 a N24 são independentemente TAT, TAC, TCA, TCT, TCC,
TCG, GGA, GGT, GGC, GGG, AGT, AGC, CGA, CGT, CGC, CGG, AGA,
ou AGG

<220>
<221> misc_feature
<222> (25)..(27)
<223> N25 a N27 são independentemente TAT, TAC, TCA, TCT, TCC,
TCG, GGA, GGT, GGC, GGG, AGT, AGC, CGA, CGT, CGC, CGG, AGA,

ou AGG

<220>
<221> misc_feature
<222> (28)..(30)
<223> N28 a N30 são independentemente TAT, TAC, TCA, TCT, TCC, TCG, GGA, GGT, GGC, GGG, AGT, AGC, CGA, CGT, CGC, CGG, AGA, ou AGG

<220>
<221> misc_feature
<222> (31)..(33)
<223> N31 a N33 são independentemente TAT, TAC, TCA, TCT, TCC, TCG, GGA, GGT, GGC, GGG, AGT, AGC, CGA, CGT, CGC, CGG, AGA, ou AGG

<220>
<221> misc_feature
<222> (34)..(36)
<223> N34 a N36 são independentemente TAT, TAC, TCA, TCT, TCC, TCG, GGA, GGT, GGC, GGG, AGT, AGC, CGA, CGT, CGC, CGG, AGA, ou AGG

<220>
<221> misc_feature
<222> (37)..(39)
<223> N37 a N39 são independentemente TAT, TAC, TCA, TCT, TCC, TCG, GGA, GGT, GGC, GGG, AGT, AGC, CGA, CGT, CGC, CGG, AGA, ou AGG

<220>
<221> misc_feature
<222> (40)..(42)
<223> N40 a N42 são independentemente TAT, TAC, TCA, TCT, TCC, TCG, GGA, GGT, GGC, GGG, AGT, AGC, CGA, CGT, CGC, CGG, AGA, ou AGG

<400> 61
gtctattatt gtgctcgcnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nngstwtkga ctactggggt 60

caagga 66

<210> 62
<211> 69
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> H3-C9 sintético

<220>
<221> misc_feature
<222> (19)..(21)
<223> N19 a N21 são independentemente TAT, TAC, TCA, TCT, TCC, TCG, AGT, AGC, GGA, GGT, GGC, GGG, CGA, CGT, CGC, CGG, AGA, ou AGG

<220>
<221> misc_feature
<222> (22)..(24)
<223> N22 a N24 são independentemente TAT, TAC, TCA, TCT, TCC, TCG, AGT, AGC, GGA, GGT, GGC, GGG, CGA, CGT, CGC, CGG, AGA, ou AGG

<220>
<221> misc_feature
<222> (25)..(27)
<223> N25 a N27 são independentemente TAT, TAC, TCA, TCT, TCC, TCG, AGT, AGC, GGA, GGT, GGC, GGG, CGA, CGT, CGC, CGG, AGA, ou AGG

<220>
<221> misc_feature
<222> (28)..(30)
<223> N28 a N30 são independentemente TAT, TAC, TCA, TCT, TCC, TCG, AGT, AGC, GGA, GGT, GGC, GGG, CGA, CGT, CGC, CGG, AGA, ou AGG

<220>
<221> misc_feature
<222> (31)..(33)
<223> N31 a N33 são independentemente TAT, TAC, TCA, TCT, TCC, TCG, AGT, AGC, GGA, GGT, GGC, GGG, CGA, CGT, CGC, CGG, AGA, ou AGG

<220>
<221> misc_feature
<222> (34)..(36)
<223> N34 a N36 são independentemente TAT, TAC, TCA, TCT, TCC, TCG, AGT, AGC, GGA, GGT, GGC, GGG, CGA, CGT, CGC, CGG, AGA, ou AGG

<220>
<221> misc_feature
<222> (37)..(39)
<223> N37 a N39 são independentemente TAT, TAC, TCA, TCT, TCC, TCG, AGT, AGC, GGA, GGT, GGC, GGG, CGA, CGT, CGC, CGG, AGA, ou AGG

<220>
<221> misc_feature
<222> (40)..(42)
<223> N40 a N42 são independentemente TAT, TAC, TCA, TCT, TCC, TCG, AGT, AGC, GGA, GGT, GGC, GGG, CGA, CGT, CGC, CGG, AGA, ou AGG

<220>
<221> misc_feature
<222> (43)..(45)
<223> N43 a N45 são independentemente TAT, TAC, TCA, TCT, TCC, TCG, AGT, AGC, GGA, GGT, GGC, GGG, CGA, CGT, CGC, CGG, AGA, ou AGG

<400> 62
gtctattatt gtgctcgcnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnngstwt kgactactgg 60

ggtcaagga 69

<210> 63
<211> 72
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> H3-C10 sintético

<220>
<221> misc_feature
<222> (19)..(21)
<223> N19 a N21 são independentemente TAT, TAC, TCA, TCT, TCC, TCG, AGT, AGC, GGA, GGT, GGC, GGG, CGA, CGT, CGC, CGG, AGA, ou AGG

<220>
<221> misc_feature
<222> (22)..(24)
<223> N22 a N24 são independentemente TAT, TAC, TCA, TCT, TCC, TCG, AGT, AGC, GGA, GGT, GGC, GGG, CGA, CGT, CGC, CGG, AGA, ou AGG

<220>
<221> misc_feature
<222> (25)..(27)
<223> N25 a N27 são independentemente TAT, TAC, TCA, TCT, TCC, TCG, AGT, AGC, GGA, GGT, GGC, GGG, CGA, CGT, CGC, CGG, AGA, ou AGG

<220>
<221> misc_feature
<222> (28)..(30)
<223> N28 a N30 são independentemente TAT, TAC, TCA, TCT, TCC, TCG, AGT, AGC, GGA, GGT, GGC, GGG, CGA, CGT, CGC, CGG, AGA, ou AGG

<220>
<221> misc_feature
<222> (31)..(33)
<223> N31 a N33 são independentemente TAT, TAC, TCA, TCT, TCC, TCG, AGT, AGC, GGA, GGT, GGC, GGG, CGA, CGT, CGC, CGG, AGA, ou AGG

<220>
<221> misc_feature
<222> (34)..(36)
<223> N34 a N36 são independentemente TAT, TAC, TCA, TCT, TCC, TCG, AGT, AGC, GGA, GGT, GGC, GGG, CGA, CGT, CGC, CGG, AGA, ou AGG

<220>

<221> misc_feature
<222> (37)..(39)
<223> N37 a N39 são independentemente TAT, TAC, TCA, TCT, TCC, TCG, AGT, AGC, GGA, GGT, GGC, GGG, CGA, CGT, CGC, CGG, AGA, ou AGG

<220>
<221> misc_feature
<222> (40)..(42)
<223> N40 a N42 são independentemente TAT, TAC, TCA, TCT, TCC, TCG, AGT, AGC, GGA, GGT, GGC, GGG, CGA, CGT, CGC, CGG, AGA, ou AGG

<220>
<221> misc_feature
<222> (43)..(45)
<223> N43 a N45 são independentemente TAT, TAC, TCA, TCT, TCC, TCG, AGT, AGC, GGA, GGT, GGC, GGG, CGA, CGT, CGC, CGG, AGA, ou AGG

<220>
<221> misc_feature
<222> (46)..(48)
<223> N46 a N48 são independentemente TAT, TAC, TCA, TCT, TCC, TCG, AGT, AGC, GGA, GGT, GGC, GGG, CGA, CGT, CGC, CGG, AGA, ou AGG

<400> 63
gtctattatt gtgctcgcnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnngs twtkgactac 60

tggggtcaag ga 72

<210> 64
<211> 75
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> H3-C11 sintético

<220>
<221> misc_feature
<222> (19)..(21)
<223> N19 a N21 são independentemente TAT, TAC, TCA, TCT, TCC, TCG, AGT, AGC, GGA, GGT, GGC, GGG, CGA, CGT, CGC, CGG, AGA, ou AGG

<220>
<221> misc_feature
<222> (22)..(24)
<223> N22 a N24 são independentemente TAT, TAC, TCA, TCT, TCC, TCG, AGT, AGC, GGA, GGT, GGC, GGG, CGA, CGT, CGC, CGG, AGA, ou AGG

<220>
<221> misc_feature

<222> (25)..(27)
<223> N25 a N27 são independentemente TAT, TAC, TCA, TCT, TCC, TCG, AGT, AGC, GGA, GGT, GGC, GGG, CGA, CGT, CGC, CGG, AGA, ou AGG

<220>
<221> misc_feature
<222> (28)..(30)
<223> N28 a N30 são independentemente TAT, TAC, TCA, TCT, TCC, TCG, AGT, AGC, GGA, GGT, GGC, GGG, CGA, CGT, CGC, CGG, AGA, ou AGG

<220>
<221> misc_feature
<222> (31)..(33)
<223> N31 a N33 são independentemente TAT, TAC, TCA, TCT, TCC, TCG, AGT, AGC, GGA, GGT, GGC, GGG, CGA, CGT, CGC, CGG, AGA, ou AGG

<220>
<221> misc_feature
<222> (34)..(36)
<223> N34 a N36 são independentemente TAT, TAC, TCA, TCT, TCC, TCG, AGT, AGC, GGA, GGT, GGC, GGG, CGA, CGT, CGC, CGG, AGA, ou AGG

<220>
<221> misc_feature
<222> (37)..(39)
<223> N37 a N39 são independentemente TAT, TAC, TCA, TCT, TCC, TCG, AGT, AGC, GGA, GGT, GGC, GGG, CGA, CGT, CGC, CGG, AGA, ou AGG

<220>
<221> misc_feature
<222> (40)..(42)
<223> N40 a N42 são independentemente TAT, TAC, TCA, TCT, TCC, TCG, AGT, AGC, GGA, GGT, GGC, GGG, CGA, CGT, CGC, CGG, AGA, ou AGG

<220>
<221> misc_feature
<222> (43)..(45)
<223> N43 a N45 são independentemente TAT, TAC, TCA, TCT, TCC, TCG, AGT, AGC, GGA, GGT, GGC, GGG, CGA, CGT, CGC, CGG, AGA, ou AGG

<220>
<221> misc_feature
<222> (46)..(48)
<223> N46 a N48 são independentemente TAT, TAC, TCA, TCT, TCC, TCG, AGT, AGC, GGA, GGT, GGC, GGG, CGA, CGT, CGC, CGG, AGA, ou AGG

<220>
<221> misc_feature

<222> (49)..(51)
<223> N49 a N51 são independentemente TAT, TAC, TCA, TCT, TCC, TCG, AGT, AGC, GGA, GGT, GGC, GGG, CGA, CGT, CGC, CGG, AGA, ou AGG

<400> 64
gtctattatt gtgctcgcnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn ngstwtkgac 60

tactggggtc aagga 75

<210> 65
<211> 78
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> H3-C12 sintético

<220>
<221> misc_feature
<222> (19)..(21)
<223> N19 a N21 são independentemente TAT, TAC, TCA, TCT, TCC, TCG, AGT, AGC, GGA, GGT, GGC, GGG, CGA, CGT, CGC, CGG, AGA, ou AGG

<220>
<221> misc_feature
<222> (22)..(24)
<223> N22 a N24 são independentemente TAT, TAC, TCA, TCT, TCC, TCG, AGT, AGC, GGA, GGT, GGC, GGG, CGA, CGT, CGC, CGG, AGA, ou AGG

<220>
<221> misc_feature
<222> (25)..(27)
<223> N25 a N27 são independentemente TAT, TAC, TCA, TCT, TCC, TCG, AGT, AGC, GGA, GGT, GGC, GGG, CGA, CGT, CGC, CGG, AGA, ou AGG

<220>
<221> misc_feature
<222> (28)..(30)
<223> N28 a N30 são independentemente TAT, TAC, TCA, TCT, TCC, TCG, AGT, AGC, GGA, GGT, GGC, GGG, CGA, CGT, CGC, CGG, AGA, ou AGG

<220>
<221> misc_feature
<222> (31)..(33)
<223> N31 a N33 são independentemente TAT, TAC, TCA, TCT, TCC, TCG, AGT, AGC, GGA, GGT, GGC, GGG, CGA, CGT, CGC, CGG, AGA, ou AGG

<220>
<221> misc_feature
<222> (34)..(36)

<223> N34 a N36 são independentemente TAT, TAC, TCA, TCT, TCC, TCG, AGT, AGC, GGA, GGT, GGC, GGG, CGA, CGT, CGC, CGG, AGA, ou AGG

<220>
<221> misc_feature
<222> (37)..(39)
<223> N37 a N39 são independentemente TAT, TAC, TCA, TCT, TCC, TCG, AGT, AGC, GGA, GGT, GGC, GGG, CGA, CGT, CGC, CGG, AGA, ou AGG

<220>
<221> misc_feature
<222> (40)..(42)
<223> N40 a N42 são independentemente TAT, TAC, TCA, TCT, TCC, TCG, AGT, AGC, GGA, GGT, GGC, GGG, CGA, CGT, CGC, CGG, AGA, ou AGG

<220>
<221> misc_feature
<222> (43)..(45)
<223> N43 a N45 são independentemente TAT, TAC, TCA, TCT, TCC, TCG, AGT, AGC, GGA, GGT, GGC, GGG, CGA, CGT, CGC, CGG, AGA, ou AGG

<220>
<221> misc_feature
<222> (46)..(48)
<223> N46 a N48 são independentemente TAT, TAC, TCA, TCT, TCC, TCG, AGT, AGC, GGA, GGT, GGC, GGG, CGA, CGT, CGC, CGG, AGA, ou AGG

<220>
<221> misc_feature
<222> (49)..(51)
<223> N49 a N51 são independentemente TAT, TAC, TCA, TCT, TCC, TCG, AGT, AGC, GGA, GGT, GGC, GGG, CGA, CGT, CGC, CGG, AGA, ou AGG

<220>
<221> misc_feature
<222> (52)..(54)
<223> N52 a N54 são independentemente TAT, TAC, TCA, TCT, TCC, TCG, AGT, AGC, GGA, GGT, GGC, GGG, CGA, CGT, CGC, CGG, AGA, ou AGG

<400> 65
gtctattatt gtgctcgcnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnngstwtk 60

gactactggg gtcaagga 78

<210> 66
<211> 81
<212> DNA
<213> Artificial
<220>

<223> H3-C13 sintético

<220>
<221> misc_feature
<222> (19)..(21)
<223> N19 a N21 são independentemente TAT, TAC, TCA, TCT, TCC, TCG, AGT, AGC, GGA, GGT, GGC, GGG, CGA, CGT, CGC, CGG. AGA, ou AGG

<220>
<221> misc_feature
<222> (22)..(24)
<223> N22 a N24 são independentemente TAT, TAC, TCA, TCT, TCC, TCG, AGT, AGC, GGA, GGT, GGC, GGG, CGA, CGT, CGC, CGG. AGA, ou AGG

<220>
<221> misc_feature
<222> (25)..(27)
<223> N19 a N21 são independentemente TAT, TAC, TCA, TCT, TCC, TCG, AGT, AGC, GGA, GGT, GGC, GGG, CGA, CGT, CGC, CGG. AGA, ou AGG

<220>
<221> misc_feature
<222> (28)..(30)
<223> N28 a N30 são independentemente TAT, TAC, TCA, TCT, TCC, TCG, AGT, AGC, GGA, GGT, GGC, GGG, CGA, CGT, CGC, CGG. AGA, ou AGG

<220>
<221> misc_feature
<222> (31)..(33)
<223> N31 a N33 são independentemente TAT, TAC, TCA, TCT, TCC, TCG, AGT, AGC, GGA, GGT, GGC, GGG, CGA, CGT, CGC, CGG. AGA, ou AGG

<220>
<221> misc_feature
<222> (34)..(36)
<223> N34 a N36 são independentemente TAT, TAC, TCA, TCT, TCC, TCG, AGT, AGC, GGA, GGT, GGC, GGG, CGA, CGT, CGC, CGG. AGA, ou AGG

<220>
<221> misc_feature
<222> (37)..(39)
<223> N37 a N39 são independentemente TAT, TAC, TCA, TCT, TCC, TCG, AGT, AGC, GGA, GGT, GGC, GGG, CGA, CGT, CGC, CGG. AGA, ou AGG

<220>
<221> misc_feature
<222> (40)..(42)
<223> N40 a N42 são independentemente TAT, TAC, TCA, TCT, TCC, TCG, AGT, AGC, GGA, GGT, GGC, GGG, CGA, CGT, CGC, CGG. AGA,

ou AGG

<220>
<221> misc_feature
<222> (43)..(45)
<223> N43 a N45 são independentemente TAT, TAC, TCA, TCT, TCC, TCG, AGT, AGC, GGA, GGT, GGC, GGG, CGA, CGT, CGC, CGG. AGA, ou AGG

<220>
<221> misc_feature
<222> (46)..(48)
<223> N46 a N48 são independentemente TAT, TAC, TCA, TCT, TCC, TCG, AGT, AGC, GGA, GGT, GGC, GGG, CGA, CGT, CGC, CGG. AGA, ou AGG

<220>
<221> misc_feature
<222> (49)..(51)
<223> N49 a N51 são independentemente TAT, TAC, TCA, TCT, TCC, TCG, AGT, AGC, GGA, GGT, GGC, GGG, CGA, CGT, CGC, CGG. AGA, ou AGG

<220>
<221> misc_feature
<222> (52)..(54)
<223> N52 a N54 são independentemente TAT, TAC, TCA, TCT, TCC, TCG, AGT, AGC, GGA, GGT, GGC, GGG, CGA, CGT, CGC, CGG. AGA, ou AGG

<220>
<221> misc_feature
<222> (55)..(57)
<223> N55 a N57 são independentemente TAT, TAC, TCA, TCT, TCC, TCG, AGT, AGC, GGA, GGT, GGC, GGG, CGA, CGT, CGC, CGG. AGA, ou AGG

<400> 66
gtctattatt gtgctcgcnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnngst 60

wtkgactact ggggtcaagg a 81

<210> 67
<211> 84
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> H3-C14 sintético

<220>
<221> misc_feature
<222> (19)..(21)
<223> N19 a N21 são independentemente TAT, TAC, TCA, TCT, TCC, TCG, AGT, AGC, GGA, GGT, GGC, GGG, CGA, CGT, CGC, CGG. AGA, ou AGG

<220>
<221> misc_feature
<222> (22)..(24)
<223> N22 a N24 são independentemente TAT, TAC, TCA, TCT, TCC, TCG, AGT, AGC, GGA, GGT, GGC, GGG, CGA, CGT, CGC, CGG. AGA, ou AGG

<220>
<221> misc_feature
<222> (25)..(27)
<223> N25 a N27 são independentemente TAT, TAC, TCA, TCT, TCC, TCG, AGT, AGC, GGA, GGT, GGC, GGG, CGA, CGT, CGC, CGG. AGA, ou AGG

<220>
<221> misc_feature
<222> (28)..(30)
<223> N28 a N30 são independentemente TAT, TAC, TCA, TCT, TCC, TCG, AGT, AGC, GGA, GGT, GGC, GGG, CGA, CGT, CGC, CGG. AGA, ou AGG

<220>
<221> misc_feature
<222> (31)..(33)
<223> N31 a N33 são independentemente TAT, TAC, TCA, TCT, TCC, TCG, AGT, AGC, GGA, GGT, GGC, GGG, CGA, CGT, CGC, CGG. AGA, ou AGG

<220>
<221> misc_feature
<222> (34)..(36)
<223> N34 a N36 são independentemente TAT, TAC, TCA, TCT, TCC, TCG, AGT, AGC, GGA, GGT, GGC, GGG, CGA, CGT, CGC, CGG. AGA, ou AGG

<220>
<221> misc_feature
<222> (37)..(39)
<223> N37 a N39 são independentemente TAT, TAC, TCA, TCT, TCC, TCG, AGT, AGC, GGA, GGT, GGC, GGG, CGA, CGT, CGC, CGG. AGA, ou AGG

<220>
<221> misc_feature
<222> (40)..(42)
<223> N40 a N42 são independentemente TAT, TAC, TCA, TCT, TCC, TCG, AGT, AGC, GGA, GGT, GGC, GGG, CGA, CGT, CGC, CGG. AGA, ou AGG

<220>
<221> misc_feature
<222> (43)..(45)
<223> N43 a N45 são independentemente TAT, TAC, TCA, TCT, TCC, TCG, AGT, AGC, GGA, GGT, GGC, GGG, CGA, CGT, CGC, CGG. AGA, ou AGG

<220>
<221> misc_feature
<222> (46)..(48)
<223> N46 a N48 são independentemente TAT, TAC, TCA, TCT, TCC, TCG, AGT, AGC, GGA, GGT, GGC, GGG, CGA, CGT, CGC, CGG. AGA, ou AGG

<220>
<221> misc_feature
<222> (49)..(51)
<223> N49 a N51 são independentemente TAT, TAC, TCA, TCT, TCC, TCG, AGT, AGC, GGA, GGT, GGC, GGG, CGA, CGT, CGC, CGG. AGA, ou AGG

<220>
<221> misc_feature
<222> (52)..(54)
<223> N52 a N54 são independentemente TAT, TAC, TCA, TCT, TCC, TCG, AGT, AGC, GGA, GGT, GGC, GGG, CGA, CGT, CGC, CGG. AGA, ou AGG

<220>
<221> misc_feature
<222> (55)..(57)
<223> N55 a N57 são independentemente TAT, TAC, TCA, TCT, TCC, TCG, AGT, AGC, GGA, GGT, GGC, GGG, CGA, CGT, CGC, CGG. AGA, ou AGG

<220>
<221> misc_feature
<222> (58)..(60)
<223> N58 a N60 são independentemente TAT, TAC, TCA, TCT, TCC, TCG, AGT, AGC, GGA, GGT, GGC, GGG, CGA, CGT, CGC, CGG. AGA, ou AGG

<400> 67
gtctattatt gtgctcgcnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn 60

gstwtkgact actggggtca agga 84

<210> 68
<211> 87
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> H3-C15 sintético

<220>
<221> misc_feature
<222> (19)..(21)
<223> N19 a N21 são independentemente TAT, TAC, TCA, TCT, TCC, TCG, AGT, AGC, GGA, GGT, GGC, GGG, CGA, CGT, CGC, CGG. AGA, ou AGG

<220>

<221> misc_feature
<222> (22)..(24)
<223> N22 a N24 são independentemente TAT, TAC, TCA, TCT, TCC, TCG, AGT, AGC, GGA, GGT, GGC, GGG, CGA, CGT, CGC, CGG. AGA, ou AGG

<220>
<221> misc_feature
<222> (25)..(27)
<223> N25 a N27 são independentemente TAT, TAC, TCA, TCT, TCC, TCG, AGT, AGC, GGA, GGT, GGC, GGG, CGA, CGT, CGC, CGG. AGA, ou AGG

<220>
<221> misc_feature
<222> (28)..(30)
<223> N28 a N30 são independentemente TAT, TAC, TCA, TCT, TCC, TCG, AGT, AGC, GGA, GGT, GGC, GGG, CGA, CGT, CGC, CGG. AGA, ou AGG

<220>
<221> misc_feature
<222> (31)..(33)
<223> N31 a N33 são independentemente TAT, TAC, TCA, TCT, TCC, TCG, AGT, AGC, GGA, GGT, GGC, GGG, CGA, CGT, CGC, CGG. AGA, ou AGG

<220>
<221> misc_feature
<222> (34)..(36)
<223> N34 a N36 são independentemente TAT, TAC, TCA, TCT, TCC, TCG, AGT, AGC, GGA, GGT, GGC, GGG, CGA, CGT, CGC, CGG. AGA, ou AGG

<220>
<221> misc_feature
<222> (37)..(39)
<223> N37 a N39 são independentemente TAT, TAC, TCA, TCT, TCC, TCG, AGT, AGC, GGA, GGT, GGC, GGG, CGA, CGT, CGC, CGG. AGA, ou AGG

<220>
<221> misc_feature
<222> (40)..(42)
<223> N40 a N42 são independentemente TAT, TAC, TCA, TCT, TCC, TCG, AGT, AGC, GGA, GGT, GGC, GGG, CGA, CGT, CGC, CGG. AGA, ou AGG

<220>
<221> misc_feature
<222> (43)..(45)
<223> N43 a N45 são independentemente TAT, TAC, TCA, TCT, TCC, TCG, AGT, AGC, GGA, GGT, GGC, GGG, CGA, CGT, CGC, CGG. AGA, ou AGG

<220>

<221> misc_feature
<222> (46)..(48)
<223> N46 a N48 são independentemente TAT, TAC, TCA, TCT, TCC, TCG, AGT, AGC, GGA, GGT, GGC, GGG, CGA, CGT, CGC, CGG. AGA, ou AGG

<220>
<221> misc_feature
<222> (49)..(51)
<223> N49 a N51 são independentemente TAT, TAC, TCA, TCT, TCC, TCG, AGT, AGC, GGA, GGT, GGC, GGG, CGA, CGT, CGC, CGG. AGA, ou AGG

<220>
<221> misc_feature
<222> (52)..(54)
<223> N52 a N54 são independentemente TAT, TAC, TCA, TCT, TCC, TCG, AGT, AGC, GGA, GGT, GGC, GGG, CGA, CGT, CGC, CGG. AGA, ou AGG

<220>
<221> misc_feature
<222> (55)..(57)
<223> N55 a N57 são independentemente TAT, TAC, TCA, TCT, TCC, TCG, AGT, AGC, GGA, GGT, GGC, GGG, CGA, CGT, CGC, CGG. AGA, ou AGG

<220>
<221> misc_feature
<222> (58)..(60)
<223> N58 a N60 são independentemente TAT, TAC, TCA, TCT, TCC, TCG, AGT, AGC, GGA, GGT, GGC, GGG, CGA, CGT, CGC, CGG. AGA, ou AGG

<220>
<221> misc_feature
<222> (61)..(63)
<223> N61 a N63 são independentemente TAT, TAC, TCA, TCT, TCC, TCG, AGT, AGC, GGA, GGT, GGC, GGG, CGA, CGT, CGC, CGG. AGA, ou AGG

<400> 68
gtctattatt gtgctcgcnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn 60

nnngstwtkg actactgggg tcaagga 87

<210> 69
<211> 90
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> H3-C16 sintético

<220>
<221> misc_feature

<222> (19)..(21)
<223> N19 a N21 são independentemente TAT, TAC, TCA, TCT, TCC, TCG, AGT, AGC, GGA, GGT, GGC, GGG, CGA, CGT, CGC, CGG. AGA, ou AGG

<220>
<221> misc_feature
<222> (22)..(24)
<223> N22 a N24 são independentemente TAT, TAC, TCA, TCT, TCC, TCG, AGT, AGC, GGA, GGT, GGC, GGG, CGA, CGT, CGC, CGG. AGA, ou AGG

<220>
<221> misc_feature
<222> (25)..(27)
<223> N25 a N27 são independentemente TAT, TAC, TCA, TCT, TCC, TCG, AGT, AGC, GGA, GGT, GGC, GGG, CGA, CGT, CGC, CGG. AGA, ou AGG

<220>
<221> misc_feature
<222> (28)..(30)
<223> N28 a N30 são independentemente TAT, TAC, TCA, TCT, TCC, TCG, AGT, AGC, GGA, GGT, GGC, GGG, CGA, CGT, CGC, CGG. AGA, ou AGG

<220>
<221> misc_feature
<222> (31)..(33)
<223> N31 a N33 são independentemente TAT, TAC, TCA, TCT, TCC, TCG, AGT, AGC, GGA, GGT, GGC, GGG, CGA, CGT, CGC, CGG. AGA, ou AGG

<220>
<221> misc_feature
<222> (34)..(36)
<223> N34 a N36 são independentemente TAT, TAC, TCA, TCT, TCC, TCG, AGT, AGC, GGA, GGT, GGC, GGG, CGA, CGT, CGC, CGG. AGA, ou AGG

<220>
<221> misc_feature
<222> (37)..(39)
<223> N37 a N39 são independentemente TAT, TAC, TCA, TCT, TCC, TCG, AGT, AGC, GGA, GGT, GGC, GGG, CGA, CGT, CGC, CGG. AGA, ou AGG

<220>
<221> misc_feature
<222> (40)..(42)
<223> N40 a N42 são independentemente TAT, TAC, TCA, TCT, TCC, TCG, AGT, AGC, GGA, GGT, GGC, GGG, CGA, CGT, CGC, CGG. AGA, ou AGG

<220>
<221> misc_feature

<222> (43)..(45)
<223> N43 a N45 são independentemente TAT, TAC, TCA, TCT, TCC, TCG, AGT, AGC, GGA, GGT, GGC, GGG, CGA, CGT, CGC, CGG. AGA, ou AGG

<220>
<221> misc_feature
<222> (46)..(48)
<223> N46 a N48 são independentemente TAT, TAC, TCA, TCT, TCC, TCG, AGT, AGC, GGA, GGT, GGC, GGG, CGA, CGT, CGC, CGG. AGA, ou AGG

<220>
<221> misc_feature
<222> (49)..(51)
<223> N49 a N51 são independentemente TAT, TAC, TCA, TCT, TCC, TCG, AGT, AGC, GGA, GGT, GGC, GGG, CGA, CGT, CGC, CGG. AGA, ou AGG

<220>
<221> misc_feature
<222> (52)..(54)
<223> N52 a N54 são independentemente TAT, TAC, TCA, TCT, TCC, TCG, AGT, AGC, GGA, GGT, GGC, GGG, CGA, CGT, CGC, CGG. AGA, ou AGG

<220>
<221> misc_feature
<222> (55)..(57)
<223> N55 a N57 são independentemente TAT, TAC, TCA, TCT, TCC, TCG, AGT, AGC, GGA, GGT, GGC, GGG, CGA, CGT, CGC, CGG. AGA, ou AGG

<220>
<221> misc_feature
<222> (58)..(60)
<223> N58 a N60 são independentemente TAT, TAC, TCA, TCT, TCC, TCG, AGT, AGC, GGA, GGT, GGC, GGG, CGA, CGT, CGC, CGG. AGA, ou AGG

<220>
<221> misc_feature
<222> (61)..(63)
<223> N61 a N63 são independentemente TAT, TAC, TCA, TCT, TCC, TCG, AGT, AGC, GGA, GGT, GGC, GGG, CGA, CGT, CGC, CGG. AGA, ou AGG

<220>
<221> misc_feature
<222> (64)..(66)
<223> N64 a N66 são independentemente TAT, TAC, TCA, TCT, TCC, TCG, AGT, AGC, GGA, GGT, GGC, GGG, CGA, CGT, CGC, CGG. AGA, ou AGG

<400> 69
gtctattatt gtgctcgcnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn 60

nnnnnngstw tkgactactg gggtcaagga 90

<210> 70
<211> 93
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> H3-C17 sintético

<220>
<221> misc_feature
<222> (19)..(21)
<223> N19 a N21 são independentemente TAT, TAC, TCA, TCT, TCC, TCG, AGT, AGC, GGA, GGT, GGC, GGG, CGA, CGT, CGC, CGG. AGA, ou AGG

<220>
<221> misc_feature
<222> (22)..(24)
<223> N21 a N24 são independentemente TAT, TAC, TCA, TCT, TCC, TCG, AGT, AGC, GGA, GGT, GGC, GGG, CGA, CGT, CGC, CGG. AGA, ou AGG

<220>
<221> misc_feature
<222> (25)..(27)
<223> N25 a N27 são independentemente TAT, TAC, TCA, TCT, TCC, TCG, AGT, AGC, GGA, GGT, GGC, GGG, CGA, CGT, CGC, CGG. AGA, ou AGG

<220>
<221> misc_feature
<222> (28)..(30)
<223> N28 a N30 são independentemente TAT, TAC, TCA, TCT, TCC, TCG, AGT, AGC, GGA, GGT, GGC, GGG, CGA, CGT, CGC, CGG. AGA, ou AGG

<220>
<221> misc_feature
<222> (31)..(33)
<223> N31 a N33 são independentemente TAT, TAC, TCA, TCT, TCC, TCG, AGT, AGC, GGA, GGT, GGC, GGG, CGA, CGT, CGC, CGG. AGA, ou AGG

<220>
<221> misc_feature
<222> (34)..(36)
<223> N34 a N36 são independentemente TAT, TAC, TCA, TCT, TCC, TCG, AGT, AGC, GGA, GGT, GGC, GGG, CGA, CGT, CGC, CGG. AGA, ou AGG

<220>
<221> misc_feature
<222> (37)..(39)
<223> N37 a N39 são independentemente TAT, TAC, TCA, TCT, TCC,

TCG, AGT, AGC, GGA, GGT, GGC, GGG, CGA, CGT, CGC, CGG. AGA, ou AGG

<220>
<221> misc_feature
<222> (40)..(42)
<223> N40 a N42 são independentemente TAT, TAC, TCA, TCT, TCC, TCG, AGT, AGC, GGA, GGT, GGC, GGG, CGA, CGT, CGC, CGG. AGA, ou AGG

<220>
<221> misc_feature
<222> (43)..(45)
<223> N43 a N45 são independentemente TAT, TAC, TCA, TCT, TCC, TCG, AGT, AGC, GGA, GGT, GGC, GGG, CGA, CGT, CGC, CGG. AGA, ou AGG

<220>
<221> misc_feature
<222> (46)..(48)
<223> N46 a N48 são independentemente TAT, TAC, TCA, TCT, TCC, TCG, AGT, AGC, GGA, GGT, GGC, GGG, CGA, CGT, CGC, CGG. AGA, ou AGG

<220>
<221> misc_feature
<222> (49)..(51)
<223> N49 a N51 são independentemente TAT, TAC, TCA, TCT, TCC, TCG, AGT, AGC, GGA, GGT, GGC, GGG, CGA, CGT, CGC, CGG. AGA, ou AGG

<220>
<221> misc_feature
<222> (52)..(54)
<223> N52 a N54 são independentemente TAT, TAC, TCA, TCT, TCC, TCG, AGT, AGC, GGA, GGT, GGC, GGG, CGA, CGT, CGC, CGG. AGA, Ou AGG

<220>
<221> misc_feature
<222> (55)..(57)
<223> N55 a N57 são independentemente TAT, TAC, TCA, TCT, TCC, TCG, AGT, AGC, GGA, GGT, GGC, GGG, CGA, CGT, CGC, CGG. AGA, ou AGG

<220>
<221> misc_feature
<222> (58)..(60)
<223> N58 a N60 são independentemente TAT, TAC, TCA, TCT, TCC, TCG, AGT, AGC, GGA, GGT, GGC, GGG, CGA, CGT, CGC, CGG. AGA, ou AGG

<220>
<221> misc_feature
<222> (61)..(63)
<223> N61 a N63 são independentemente TAT, TAC, TCA, TCT, TCC,

TCG, AGT, AGC, GGA, GGT, GGC, GGG, CGA, CGT, CGC, CGG. AGA, ou AGG

<220>
<221> misc_feature
<222> (64)..(66)
<223> N64 a N66 são independentemente TAT, TAC, TCA, TCT, TCC, TCG, AGT, AGC, GGA, GGT, GGC, GGG, CGA, CGT, CGC, CGG. AGA, ou AGG

<220>
<221> misc_feature
<222> (67)..(69)
<223> N67 a N69 são independentemente TAT, TAC, TCA, TCT, TCC, TCG, AGT, AGC, GGA, GGT, GGC, GGG, CGA, CGT, CGC, CGG. AGA, ou AGG

<400> 70
gtctattatt gtgctcgcnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn 60

nnnnnnnnng stwtkgacta ctggggtcaa gga 93

<210> 71
<211> 60
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> H3-C6 sintético

<220>
<221> misc_feature
<222> (19)..(36)
<223> N19 a N36 é qualquer combinação de A, T, C, ou G, exceto TGT, TGC, TGA, TAA, TAG

<400> 71
gtctattatt gtgctcgcnn nnnnnnnnnn nnnnnngstw tkgactactg gggtcaagga 60

<210> 72
<211> 63
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> H3-C7 sintético

<220>
<221> misc_feature
<222> (19)..(39)
<223> N19 a N39 é qualquer combinação de A, T, C, ou G, exceto TGT, TGC, TGA, TAA, TAG

<400> 72
gtctattatt gtgctcgcnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnng stwtkgacta ctggggtcaa 60

gga 63

<210> 73
<211> 66
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> H3-C8 sintético

<220>
<221> misc_feature
<222> (19)..(42)
<223> N19 a N42 é qualquer combinação de A, T, C, ou G, exceto TGT, TGC, TGA, TAA, TAG

<400> 73
gtctattatt gtgctcgcnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nngstwtkga ctactggggt 60

caagga 66

<210> 74
<211> 69
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> H3-C9 sintético

<220>
<221> misc_feature
<222> (19)..(45)
<223> N19 a N45 é qualquer combinação de A, T, C, ou G, exceto TGT, TGC, TGA, TAA, TAG

<400> 74
gtctattatt gtgctcgcnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnngstwt kgactactgg 60

ggtcaagga 69

<210> 75
<211> 72
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> H3-C10 sintético

<220>
<221> misc_feature
<222> (19)..(48)
<223> N19 a N48 é qualquer combinação de A, T, C, ou G, exceto TGT, TGC, TGA, TAA, TAG

<400> 75
gtctattatt gtgctcgcnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnngs twtkgactac 60

tggggtcaag ga 72

<210> 76
<211> 75
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> synthetic H3-C11

<220>
<221> misc_feature
<222> (19)..(51)
<223> N19 a N51 é qualquer combinação de A, T, C, ou G, exceto TGT, TGC, TGA, TAA, TAG

<400> 76
gtctattatt gtgctcgcnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn ngstwtkgac 60

tactggggtc aagga 75

<210> 77
<211> 78
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> H3-C12 sintético

<220>
<221> misc_feature
<222> (19)..(54)
<223> N19 a N54 é qualquer combinação de A, T, C, ou G, exceto TGT, TGC, TGA, TAA, TAG

<400> 77
gtctattatt gtgctcgcnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnngstwtk 60

gactactggg gtcaagga 78

<210> 78
<211> 81
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> H3-C13 sintético

<220>
<221> misc_feature
<222> (19)..(57)
<223> N19 a N57 é qualquer combinação de A, T, C, ou G, exceto TGT, TGC, TGA, TAA, TAG

<400> 78

gtctattatt gtgctcgcnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnngst 60

wtkgactact ggggtcaagg a 81

<210> 79
<211> 84
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> H3-C14 sintético

<220>
<221> misc_feature
<222> (19)..(60)
<223> N19 a N60 é qualquer combinação de A, T, C, ou G, exceto TGT, TGC, TGA, TAA, TAG

<400> 79
gtctattatt gtgctcgcnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn 60

gstwtkgact actggggtca agga 84

<210> 80
<211> 87
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> H3-C15 sintético

<220>
<221> misc_feature
<222> (19)..(63)
<223> N19 a N63 é qualquer combinação de A, T, C, ou G, exceto TGT, TGC, TGA, TAA, TAG

<400> 80
gtctattatt gtgctcgcnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn 60

nnngstwtkg actactgggg tcaagga 87

<210> 81
<211> 90
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> synthetic H3-C16

<220>
<221> misc_feature
<222> (19)..(66)
<223> N19 a N66 é qualquer combinação de A, T, C, ou G, exceto TGT, TGC, TGA, TAA, TAG

<400> 81
gtctattatt gtgctcgcnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn 60

nnnnnngstw tkgactactg gggtcaagga 90

<210> 82
<211> 93
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> H3-C17 sintético

<220>
<221> misc_feature
<222> (19)..(69)
<223> N19 a N69 é qualquer combinação de A, T, C, ou G, exceto TGT, TGC, TGA, TAA, TAG

<400> 82
gtctattatt gtgctcgcnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn 60

nnnnnnnnng stwtkgacta ctggggtcaa gga 93

<210> 83
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Artificial clone 1CDRL3 ligante de HER2 sintético

<400> 83

Gln Gln Ser Tyr Tyr Ser Pro Ser Thr
1 5

<210> 84
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Artificial clone 3CDRL3 ligante de HER2 sintético

<400> 84

Gln Gln Ser Ser Tyr Tyr Pro Ser Thr
1 5

<210> 85
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial
<220>

<223> Artificial clone 3CDRL3 ligante de HER2 sintético

<400> 85

Gln Gln Ser Ser Tyr Tyr Pro Ser Thr
1 5

<210> 86
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Artificial clone 4CDRL3 ligante de HER2 sintético

<400> 86

Gln Gln Ser Tyr Tyr Ser Pro Ser Thr
1 5

<210> 87
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Artificial clone 5CDRL3 ligante de HER2 sintético

<400> 87

Gln Gln Ser Tyr Tyr Tyr Pro Ser Thr
1 5

<210> 88
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Artificial clone 6CDRL3 ligante de HER2 sintético

<400> 88

Gln Gln Ser Tyr Tyr Ser Pro Ser Thr
1 5

<210> 89
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Artificial clone 7CDRL3 ligante de HER2 sintético

<400> 89
Gln Gln Ser Tyr Tyr Tyr Pro Ser Thr
1 5

<210> 90
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Artificial clone 8CDRL3 ligante de HER2 sintético

<400> 90

Gln Gln Tyr Tyr Tyr Tyr Pro Tyr Thr
1 5

<210> 91
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Artificial clone 9CDRL3 ligante de HER2 sintético

<400> 91

Gln Gln Tyr Tyr Tyr Ser Pro Ser Thr
1 5

<210> 92
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Artificial clone 10CDRL3 ligante de HER2 sintético

<400> 92

Gln Gln Ser Tyr Tyr Tyr Pro Tyr Thr
1 5

<210> 93
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Artificial clone 11CDRL3 ligante de HER2 sintético

<400> 93

Gln Gln Ser Ser Tyr Ser Pro Tyr Thr
1 5

<210> 94
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Artificial clone 12CDRL3 ligante de HER2 sintético

<400> 94

Gln Gln His Tyr Thr Thr Pro Pro Thr
1 5

<210> 95
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Artificial clone 13CDRL3 ligante de HER2 sintético

<400> 95

Gln Gln Tyr Ser Tyr Tyr Pro Tyr Thr
1 5

<210> 96
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Artificial clone 14CDRL3 ligante de HER2 sintético

<400> 96

Gln Gln Tyr Ser Tyr Tyr Pro Ser Thr
1 5

<210> 97
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Artificial clone 15CDRL3 ligante de HER2 sintético

<400> 97

Gln Gln Tyr Ser Tyr Tyr Pro Tyr Thr
1 5

<210> 98
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Artificial clone 16CDRL3 ligante de HER2 sintético

<400> 98

Gln Gln Ser Ser Tyr Ser Pro Ser Thr
1 5

<210> 99
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Artificial clone 17CDRL3 ligante de HER2 sintético

<400> 99

Gln Gln Tyr Ser Tyr Tyr Pro Tyr Thr
1 5

<210> 100
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Artificial clone 18CDRL3 ligante de HER2 sintético

<400> 100

Gln Gln Tyr Ser Tyr Tyr Pro Ser Thr
1 5

<210> 101
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Artificial clone 19CDRL3 ligante de HER2 sintético

<400> 101

Gln Gln Tyr Ser Tyr Tyr Pro Tyr Thr
1 5

<210> 102
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Artificial clone 20CDRL3 ligante de HER2 sintético

<400> 102

Gln Gln Tyr Ser Tyr Tyr Pro Tyr Thr
1 5

<210> 103

<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Artificial clone 21CDRL3 ligante de HER2 sintético

<400> 103

Gln Gln Tyr Ser Tyr Tyr Pro Tyr Thr
1 5

<210> 104
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Artificial clone 22CDRL3 ligante de HER2 sintético

<400> 104

Gln Gln Tyr Ser Tyr Tyr Pro Tyr Thr
1 5

<210> 105
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Artificial clone 23CDRL3 ligante de HER2 sintético

<400> 105

Gln Gln Tyr Ser Tyr Tyr Pro Tyr Thr
1 5

<210> 106
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Artificial clone 24CDRL3 ligante de HER2 sintético

<400> 106

Gln Gln Tyr Ser Tyr Tyr Pro Tyr Thr
1 5

<210> 107
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial
<220>

<223> Artificial clone 25CDRL3 ligante de HER2 sintético

<400> 107

Gln Gln Tyr Ser Tyr Tyr Pro Ser Thr
1 5

<210> 108
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Artificial clone 26CDRL3 ligante de HER2 sintético

<400> 108

Gln Gln Tyr Ser Tyr Tyr Pro Ser Thr
1 5

<210> 109
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Artificial clone 27CDRL3 ligante de HER2 sintético

<400> 109

Gln Gln Tyr Ser Tyr Tyr Pro Tyr Thr
1 5

<210> 110
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Artificial clone 28CDRL3 ligante de HER2 sintético

<400> 110

Gln Gln Tyr Ser Tyr Tyr Pro Tyr Thr
1 5

<210> 111
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Artificial clone 29CDRL3 ligante de HER2 sintético

<400> 111
Gln Gln Ser Ser Tyr Ser Pro Ser Thr
1 5

<210> 112
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Artificial clone 30CDRL3 ligante de HER2 sintético

<400> 112

Gln Gln Ser Ser Tyr Tyr Pro Tyr Thr
1 5

<210> 113
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Artificial clone 31CDRL3 ligante de HER2 sintético

<400> 113

Gln Gln Ser Tyr Tyr Tyr Pro Ser Thr
1 5

<210> 114
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Artificial clone 32CDRL3 ligante de HER2 sintético

<400> 114

Gln Gln Ser Ser Tyr Tyr Pro Tyr Thr
1 5

<210> 115
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Artificial clone 33CDRL3 ligante de HER2 sintético

<400> 115

Gln Gln Ser Phe Ser Ser Pro Tyr Thr
1 5

<210> 116
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Artificial clone 34CDRL3 ligante de HER2 sintético

<400> 116

Gln Gln Ser Tyr Ser Ser Pro Tyr Thr
1 5

<210> 117
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Artificial clone 35CDRL3 ligante de HER2 sintético

<400> 117

Gln Gln Ser Tyr Ser Tyr Pro Ser Thr
1 5

<210> 118
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Artificial clone 36CDRL3 ligante de HER2 sintético

<400> 118

Gln Gln Ser Phe Ser Tyr Pro Tyr Thr
1 5

<210> 119
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Artificial clone 37CDRL3 ligante de HER2 sintético

<400> 119

Gln Gln Ser Tyr Ser Ser Pro Tyr Thr
1 5

<210> 120
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Artificial clone 38CDRL3 ligante de HER2 sintético

<400> 120

Gln Gln Ser Tyr Ser Ser Pro Ser Thr
1 5

<210> 121
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Artificial clone 39CDRL3 ligante de HER2 sintético

<400> 121

Gln Gln Ser Tyr Ser Tyr Pro Ser Thr
1 5

<210> 122
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Artificial clone 40CDRL3 ligante de HER2 sintético

<400> 122

Gln Gln Ser Tyr Ser Ser Pro Tyr Thr
1 5

<210> 123
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Artificial clone 41CDRL3 ligante de HER2 sintético

<400> 123

Gln Gln Ser Tyr Ser Ser Pro Ser Thr
1 5

<210> 124
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Artificial clone 42CDRL3 ligante de HER2 sintético

<400> 124

Gln Gln Ser Tyr Ser Ser Pro Ser Thr
1 5

<210> 125

<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Artificial clone 43CDRL3 ligante de HER2 sintético

<400> 125

Gln Gln Ser Phe Ser Ser Pro Ser Thr
1 5

<210> 126
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Artificial clone 44CDRL3 ligante de HER2 sintético

<400> 126

Gln Gln Ser Ser Ser Ser Pro Tyr Thr
1 5

<210> 127
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Artificial clone 45CDRL3 ligante de HER2 sintético

<400> 127

Gln Gln Ser Tyr Ser Ser Pro Tyr Thr
1 5

<210> 128
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Artificial clone 46CDRL3 ligante de HER2 sintético

<400> 128

Gln Gln Ser Ser Ser Ser Pro Tyr Thr
1 5

<210> 129
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial
<220>

<223> Artificial clone 47CDRL3 ligante de HER2 sintético

<400> 129

Gln Gln Ser Tyr Ser Ser Pro Ser Thr
1 5

<210> 130
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Artificial clone 48CDRL3 ligante de HER2 sintético

<400> 130

Gln Gln Ser Ser Ser Tyr Pro Tyr Thr
1 5

<210> 131
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Artificial clone 49CDRL3 ligante de HER2 sintético

<400> 131

Gln Gln Ser Tyr Ser Tyr Pro Ser Thr
1 5

<210> 132
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Artificial clone 50CDRL3 ligante de HER2 sintético

<400> 132

Gln Gln Ser Ser Ser Ser Pro Tyr Thr
1 5

<210> 133
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Artificial clone 51CDRL3 ligante de HER2 sintético

<400> 133
Gln Gln Ser Ser Ser Tyr Pro Tyr Thr
1 5

<210> 134
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Artificial clone 52CDRL3 ligante de HER2 sintético

<400> 134

Gln Gln Ser Ser Ser Tyr Pro Ser Thr
1 5

<210> 135
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Artificial clone 53CDRL3 ligante de HER2 sintético

<400> 135

Gln Gln Ser Tyr Ser Ser Pro Ser Thr
1 5

<210> 136
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Artificial clone 54CDRL3 ligante de HER2 sintético

<400> 136

Gln Gln Ser Ser Ser Ser Pro Tyr Thr
1 5

<210> 137
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Artificial clone 55CDRL3 ligante de HER2 sintético

<400> 137

Gln Gln Ser Ser Ser Tyr Pro Ser Thr
1 5

<210> 138
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Artificial clone 56CDRL3 ligante de HER2 sintético

<400> 138

Gln Gln Ser Ser Tyr Tyr Pro Ser Thr
1 5

<210> 139
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Artificial clone 57CDRL3 ligante de HER2 sintético

<400> 139

Gln Gln Ser Ser Phe Ser Pro Tyr Thr
1 5

<210> 140
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Artificial clone 58CDRL3 ligante de HER2 sintético

<400> 140

Gln Gln Ser Ser Ser Tyr Pro Tyr Thr
1 5

<210> 141
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Artificial clone 59CDRL3 ligante de HER2 sintético

<400> 141

Gln Gln Ser Ser Ser Tyr Pro Ser Thr
1 5

<210> 142
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Artificial clone 60CDRL3 ligante de HER2 sintético

<400> 142

Gln Gln Ser Ser Ser Ser Pro Tyr Thr
1 5

<210> 143
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Artificial clone 61CDRL3 ligante de HER2 sintético

<400> 143

Gln Gln Ser Tyr Ser Ser Pro Tyr Thr
1 5

<210> 144
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Artificial clone 62CDRL3 ligante de HER2 sintético

<400> 144

Gln Gln Ser Tyr Ser Ser Pro Ser Thr
1 5

<210> 145
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Artificial clone 63CDRL3 ligante de HER2 sintético

<400> 145

Gln Gln Ser Tyr Ser Ser Pro Ser Thr
1 5

<210> 146
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Artificial clone 64CDRL3 ligante de HER2 sintético

<400> 146

Gln Gln Ser Ser Ser Tyr Pro Tyr Thr
1 5

<210> 147

<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Artificial clone 65CDRL3 ligante de HER2 sintético

<400> 147

Gln Gln Ser Phe Ser Ser Pro Tyr Thr
1 5

<210> 148
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Artificial clone 66CDRL3 ligante de HER2 sintético

<400> 148

Gln Gln Ser Tyr Ser Tyr Pro Ser Thr
1 5

<210> 149
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Artificial clone 67CDRL3 ligante de HER2 sintético

<400> 149

Gln Gln Ser Tyr Ser Ser Pro Tyr Thr
1 5

<210> 150
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Artificial clone 68CDRL3 ligante de HER2 sintético

<400> 150

Gln Gln Tyr Tyr Ser Ser Pro Tyr Thr
1 5

<210> 151
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial
<220>

<223> Artificial clone 69CDRL3 ligante de HER2 sintético

<400> 151

Gln Gln Ser Ser Ser Tyr Pro Ser Thr
1 5

<210> 152
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Artificial clone 70CDRL3 ligante de HER2 sintético

<400> 152

Gln Gln Tyr Tyr Ser Ser Pro Ser Thr
1 5

<210> 153
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Artificial clone 71CDRL3 ligante de HER2 sintético

<400> 153

Gln Gln Ser Ser Tyr Tyr Pro Ser Thr
1 5

<210> 154
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Artificial clone 72CDRL3 ligante de HER2 sintético

<400> 154

Gln Gln Ser Ser Phe Tyr Pro Ser Thr
1 5

<210> 155
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Artificial clone 73CDRL3 ligante de HER2 sintético

<400> 155
Gln Gln Ser Ser Tyr Ser Pro Tyr Thr
1 5

<210> 156
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Artificial clone 74CDRL3 ligante de HER2 sintético

<400> 156

Gln Gln Ser Ser Ser Tyr Pro Ser Thr
1 5

<210> 157
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Artificial clone 75CDRL3 ligante de HER2 sintético

<400> 157

Gln Gln Ser Ser Ser Ser Pro Ser Thr
1 5

<210> 158
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Artificial clone 76CDRL3 ligante de HER2 sintético

<400> 158

Gln Gln Tyr Tyr Tyr Tyr Pro Tyr Thr
1 5

<210> 159
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Artificial clone 77CDRL3 ligante de HER2 sintético

<400> 159

Gln Gln Ser Ser Tyr Ser Pro Tyr Thr
1 5

<210> 160
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Artificial clone 78CDRL3 ligante de HER2 sintético

<400> 160

Gln Gln Ser Ser Tyr Ser Pro Tyr Thr
1 5

<210> 161
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Artificial clone 79CDRL3 ligante de HER2 sintético

<400> 161

Gln Gln Ser Ser Tyr Ser Pro Tyr Thr
1 5

<210> 162
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Artificial clone 80CDRL3 ligante de HER2 sintético

<400> 162

Gln Gln Tyr Tyr Ser Ser Pro Tyr Thr
1 5

<210> 163
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Artificial clone 81CDRL3 ligante de HER2 sintético

<400> 163

Gln Gln Ser Tyr Ser Tyr Pro Ser Thr
1 5

<210> 164
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Artificial clone 82CDRL3 ligante de HER2 sintético

<400> 164

Gln Gln Tyr Ser Tyr Tyr Pro Ser Thr
1 5

<210> 165
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Artificial clone 83CDRL3 ligante de HER2 sintético

<400> 165

Gln Gln Ser Ser Tyr Ser Pro Tyr Thr
1 5

<210> 166
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Artificial clone 84CDRL3 ligante de HER2 sintético

<400> 166

Gln Gln Ser Ser Tyr Ser Pro Tyr Thr
1 5

<210> 167
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Artificial clone 85CDRL3 ligante de HER2 sintético

<400> 167

Gln Gln Ser Ser Tyr Ser Pro Tyr Thr
1 5

<210> 168
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Artificial clone 86CDRL3 ligante de HER2 sintético

<400> 168

Gln Gln Ser Ser Tyr Ser Pro Tyr Thr
1 5

<210> 169

<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Artificial clone 87CDRL3 ligante de HER2 sintético

<400> 169

Gln Gln Tyr Ser Tyr Tyr Pro Ser Thr
1 5

<210> 170
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Artificial clone 88CDRL3 ligante de HER2 sintético

<400> 170

Gln Gln Ser Ser Ser Ser Pro Tyr Thr
1 5

<210> 171
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Artificial clone 89CDRL3 ligante de HER2 sintético

<400> 171

Gln Gln Ser Ser Tyr Ser Pro Tyr Thr
1 5

<210> 172
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Artificial clone 90CDRL3 ligante de HER2 sintético

<400> 172

Gln Gln Ser Ser Tyr Ser Pro Tyr Thr
1 5

<210> 173
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial
<220>

<223> Artificial clone 91CDRL3 ligante de HER2 sintético

<400> 173

Gln Gln Ser Ser Ser Ser Pro Tyr Thr
1 5

<210> 174
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Artificial clone 92CDRL3 ligante de HER2 sintético

<400> 174

Gln Gln Tyr Tyr Ser Ser Pro Tyr Thr
1 5

<210> 175
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Artificial clone 93CDRL3 ligante de HER2 sintético

<400> 175

Gln Gln Ser Ser Ser Ser Pro Tyr Thr
1 5

<210> 176
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Artificial clone 94CDRL3 ligante de HER2 sintético

<400> 176

Gln Gln Ser Ser Tyr Tyr Pro Tyr Thr
1 5

<210> 177
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Artificial clone 95CDRL3 ligante de HER2 sintético

<400> 177
Gln Gln Ser Tyr Tyr Tyr Pro Tyr Thr
1 5

<210> 178
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Artificial clone 96CDRL3 ligante de HER2 sintético

<400> 178

Gln Gln Tyr Tyr Tyr Ser Pro Ser Thr
1 5

<210> 179
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Artificial clone 97CDRL3 ligante de HER2 sintético

<400> 179

Gln Gln Tyr Ser Tyr Tyr Pro Tyr Thr
1 5

<210> 180
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Artificial clone 98CDRL3 ligante de HER2 sintético

<400> 180

Gln Gln Tyr Ser Tyr Tyr Pro Tyr Thr
1 5

<210> 181
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Artificial clone 99CDRL3 ligante de HER2 sintético

<400> 181

Gln Gln Tyr Ser Tyr Tyr Pro Tyr Thr
1 5

<210> 182
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Artificial clone 100CDRL3 ligante de HER2 sintético

<400> 182

Gln Gln Ser Ser Tyr Tyr Pro Tyr Thr
1 5

<210> 183
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Artificial clone 101CDRL3 ligante de HER2 sintético

<400> 183

Gln Gln Tyr Ser Tyr Tyr Pro Tyr Thr
1 5

<210> 184
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Artificial clone 102CDRL3 ligante de HER2 sintético

<400> 184

Gln Gln Tyr Ser Tyr Tyr Pro Tyr Thr
1 5

<210> 185
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Artificial clone 103CDRL3 ligante de HER2 sintético

<400> 185

Gln Gln Tyr Ser Tyr Tyr Pro Ser Thr
1 5

<210> 186
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Artificial clone 104CDRL3 ligante de HER2 sintético

<400> 186

Gln Gln Tyr Ser Ser Ser Pro Ser Thr
1 5

<210> 187
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Artificial clone 105CDRL3 ligante de HER2 sintético

<400> 187

Gln Gln Tyr Ser Ser Ser Pro Tyr Thr
1 5

<210> 188
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Artificial clone 106CDRL3 ligante de HER2 sintético

<400> 188

Gln Gln Ser Tyr Ser Ser Pro Ser Thr
1 5

<210> 189
<211> 10
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Artificial clone 1CDRL3 ligante de HER2 sintético

<400> 189

Gly Phe Ser Ile Ser Ser Ser Tyr Ile His
1 5 10

<210> 190
<211> 10
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Artificial clone 2CDRL3 ligante de HER2 sintético

<400> 190

Gly Phe Ser Ile Tyr Ser Ser Tyr Ile His
1 5 10

<210> 191

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

<220>
<223> Artificial clone 3CDRL3 ligante de HER2 sintético

<400> 191

Gly Phe Ser Ile Ser Ser Ser Tyr Ile His
1 5 10

<210> 192
<211> 10
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Artificial clone 4CDRL3 ligante de HER2 sintético

<400> 192

Gly Phe Tyr Ile Ser Tyr Ser Tyr Ile His
1 5 10

<210> 193
<211> 10
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Artificial clone 5CDRL3 ligante de HER2 sintético

<400> 193

Gly Phe Tyr Ile Ser Ser Ser Tyr Ile His
1 5 10

<210> 194
<211> 10
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Artificial clone 6CDRL3 ligante de HER2 sintético

<400> 194

Gly Phe Ser Ile Ser Tyr Ser Tyr Ile His
1 5 10

<210> 195
<211> 10
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Artificial clone 7CDRL3 ligante de HER2 sintético

<400> 195

Gly Phe Ser Ile Tyr Tyr Ser Tyr Ile His
1 5 10

<210> 196
<211> 10
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Artificial clone 8CDRL3 ligante de HER2 sintético

<400> 196

Gly Phe Ser Ile Tyr Ser Ser Tyr Ile His
1 5 10

<210> 197
<211> 10
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Artificial clone 9CDRL3 ligante de HER2 sintético

<400> 197

Gly Phe Ser Ile Ser Tyr Ser Tyr Ile His
1 5 10

<210> 198
<211> 10
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Artificial clone 10CDRL3 ligante de HER2 sintético

<400> 198

Gly Phe Ser Ile Tyr Ser Ser Tyr Ile His
1 5 10

<210> 199
<211> 10
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Artificial clone 11CDRL3 ligante de HER2 sintético

<400> 199

Gly Phe Ser Ile Tyr Ser Ser Ser Ile His
1 5 10

<210> 200
<211> 10
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Artificial clone 12CDRL3 ligante de HER2 sintético

<400> 200

Gly Phe Ser Ile Ser Ser Tyr Ser Ile His
1 5 10

<210> 201
<211> 10
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Artificial clone 13CDRL3 ligante de HER2 sintético

<400> 201

Gly Phe Ser Ile Ser Ser Ser Ser Ile His
1 5 10

<210> 202
<211> 10
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Artificial clone 14CDRL3 ligante de HER2 sintético

<400> 202

Gly Phe Tyr Ile Ser Ser Ser Ser Ile His
1 5 10

<210> 203
<211> 10
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Artificial clone 15CDRL3 ligante de HER2 sintético

<400> 203

Gly Phe Ser Ile Ser Ser Ser Ser Ile His
1 5 10

<210> 204

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

<220>
<223> Artificial clone 16CDRL3 ligante de HER2 sintético

<400> 204

Gly Phe Tyr Ile Ser Ser Tyr Ser Ile His
1 5 10

<210> 205
<211> 10
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Artificial clone 17CDRL3 ligante de HER2 sintético

<400> 205

Gly Phe Tyr Ile Ser Tyr Ser Ser Ile His
1 5 10

<210> 206
<211> 10
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Artificial clone 18CDRL3 ligante de HER2 sintético

<400> 206

Gly Phe Ser Ile Ser Tyr Ser Ser Ile His
1 5 10

<210> 207
<211> 10
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Artificial clone 19CDRL3 ligante de HER2 sintético

<400> 207

Gly Phe Tyr Ile Ser Ser Tyr Ser Ile His
1 5 10

<210> 208
<211> 10
<212> PRT
<213> Artificial
<220>

<223> Artificial clone 20CDRL3 ligante de HER2 sintético

<400> 208

Gly Phe Ser Ile Ser Tyr Ser Ser Ile His
1 5 10

<210> 209
<211> 10
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Artificial clone 21CDRL3 ligante de HER2 sintético

<400> 209

Gly Phe Tyr Ile Ser Tyr Ser Ser Ile His
1 5 10

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

<220>
<223> Artificial clone 22CDRL3 ligante de HER2 sintético

<400> 210

Gly Phe Ser Ile Ser Tyr Ser Ser Ile His
1 5 10

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

<220>
<223> Artificial clone 23CDRL3 ligante de HER2 sintético

<400> 211

Gly Phe Ser Ile Ser Tyr Ser Ser Ile His
1 5 10

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

<220>
<223> Artificial clone 24CDRL3 ligante de HER2 sintético

<400> 212

Gly Phe Ser Ile Ser Tyr Ser Ser Ile His
1 5 10

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

<220>
<223> Artificial clone 25CDRL3 ligante de HER2 sintético

<400> 213

Gly Phe Ser Ile Ser Tyr Ser Ser Ile His
1 5 10

<210> 214
<211> 10
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Artificial clone 26CDRL3 ligante de HER2 sintético

<400> 214

Gly Phe Tyr Ile Ser Tyr Ser Ser Ile His
1 5 10

<210> 215
<211> 10
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Artificial clone 27CDRL3 ligante de HER2 sintético

<400> 215

Gly Phe Ser Ile Ser Tyr Ser Ser Ile His
1 5 10

<210> 216
<211> 10
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Artificial clone 28CDRL3 ligante de HER2 sintético

<400> 216

Gly Phe Ser Ile Ser Tyr Ser Ser Ile His
1 5 10

<210> 217

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

<220>
<223> Artificial clone 29CDRL3 ligante de HER2 sintético

<400> 217

Gly Phe Ser Ile Tyr Ser Ser Ser Ile His
1 5 10

<210> 218
<211> 10
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Artificial clone 30CDRL3 ligante de HER2 sintético

<400> 218

Gly Phe Ser Ile Ser Tyr Ser Ser Ile His
1 5 10

<210> 219
<211> 10
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Artificial clone 31CDRL3 ligante de HER2 sintético

<400> 219

Gly Phe Ser Ile Ser Tyr Ser Ser Ile His
1 5 10

<210> 220
<211> 10
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Artificial clone 32CDRL3 ligante de HER2 sintético

<400> 220

Gly Phe Ser Ile Ser Ser Ser Ser Ile His
1 5 10

<210> 221
<211> 10
<212> PRT
<213> Artificial
<220>

<223> synthetic HER2 binding clone 33 CDRH1

<400> 221

Gly Phe Ser Ile Ser Ser Tyr Tyr Ile His
1 5 10

<210> 222
<211> 10
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Artificial clone 34CDRL3 ligante de HER2 sintético

<400> 222

Gly Phe Tyr Ile Ser Ser Ser Ser Ile His
1 5 10

<210> 223
<211> 10
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Artificial clone 35CDRL3 ligante de HER2 sintético

<400> 223

Gly Phe Tyr Ile Ser Ser Ser Ser Ile His
1 5 10

<210> 224
<211> 10
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Artificial clone 36CDRL3 ligante de HER2 sintético

<400> 224

Gly Phe Ser Ile Ser Ser Ser Ser Ile His
1 5 10

<210> 225
<211> 10
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Artificial clone 37CDRL3 ligante de HER2 sintético

<400> 225

Gly Phe Tyr Ile Ser Ser Tyr Ser Ile His
1 5 10

<210> 226
<211> 10
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Artificial clone 38CDRL3 ligante de HER2 sintético

<400> 226

Gly Phe Tyr Ile Ser Ser Ser Ser Ile His
1 5 10

<210> 227
<211> 10
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Artificial clone 39CDRL3 ligante de HER2 sintético

<400> 227

Gly Phe Ser Ile Ser Ser Ser Ser Ile His
1 5 10

<210> 228
<211> 10
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Artificial clone 40CDRL3 ligante de HER2 sintético

<400> 228

Gly Phe Tyr Ile Ser Ser Ser Ser Ile His
1 5 10

<210> 229
<211> 10
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Artificial clone 41CDRL3 ligante de HER2 sintético

<400> 229

Gly Phe Ser Ile Ser Ser Ser Ser Ile His
1 5 10

<210> 230

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

<220>
<223> Artificial clone 42CDRL3 ligante de HER2 sintético

<400> 230

Gly Phe Tyr Ile Ser Ser Ser Ser Ile His
1 5 10

<210> 231
<211> 10
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Artificial clone 43CDRL3 ligante de HER2 sintético

<400> 231

Gly Phe Ser Ile Ser Ser Ser Ser Ile His
1 5 10

<210> 232
<211> 10
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Artificial clone 44CDRL3 ligante de HER2 sintético

<400> 232

Gly Phe Ser Ile Ser Ser Ser Ser Ile His
1 5 10

<210> 233
<211> 10
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Artificial clone 45CDRL3 ligante de HER2 sintético

<400> 233

Gly Phe Tyr Ile Ser Ser Ser Ser Ile His
1 5 10

<210> 234
<211> 10
<212> PRT
<213> Artificial
<220>

<223> Artificial clone 46CDRL3 ligante de HER2 sintético

<400> 234

Gly Phe Tyr Ile Ser Ser Tyr Ser Ile His
1 5 10

<210> 235
<211> 10
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Artificial clone 47CDRL3 ligante de HER2 sintético

<400> 235

Gly Phe Ser Ile Ser Ser Tyr Ser Ile His
1 5 10

<210> 236
<211> 10
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Artificial clone 48CDRL3 ligante de HER2 sintético

<400> 236

Gly Phe Tyr Ile Ser Ser Tyr Tyr Ile His
1 5 10

<210> 237
<211> 10
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Artificial clone 49CDRL3 ligante de HER2 sintético

<400> 237

Gly Phe Ser Ile Ser Ser Tyr Ser Ile His
1 5 10

<210> 238
<211> 10
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Artificial clone 50CDRL3 ligante de HER2 sintético

<400> 238

Gly Phe Tyr Ile Ser Ser Ser Ser Ile His
1 5 10

<210> 239
<211> 10
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Artificial clone 51CDRL3 ligante de HER2 sintético

<400> 239

Gly Phe Ser Ile Ser Ser Ser Ser Ile His
1 5 10

<210> 240
<211> 10
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Artificial clone 52CDRL3 ligante de HER2 sintético

<400> 240

Gly Phe Tyr Ile Ser Ser Ser Ser Ile His
1 5 10

<210> 241
<211> 10
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Artificial clone 53CDRL3 ligante de HER2 sintético

<400> 241

Gly Phe Tyr Ile Ser Ser Ser Ser Ile His
1 5 10

<210> 242
<211> 10
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Artificial clone 54CDRL3 ligante de HER2 sintético

<400> 242

Gly Phe Tyr Ile Ser Ser Ser Ser Ile His
1 5 10

<210> 243

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

<220>
<223> Artificial clone 55CDRL3 ligante de HER2 sintético

<400> 243

Gly Phe Ser Ile Ser Ser Ser Ser Ile His
1 5 10

<210> 244
<211> 10
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Artificial clone 56CDRL3 ligante de HER2 sintético

<400> 244

Gly Phe Ser Ile Ser Ser Ser Ser Ile His
1 5 10

<210> 245
<211> 10
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Artificial clone 57CDRL3 ligante de HER2 sintético

<400> 245

Gly Phe Tyr Ile Ser Ser Ser Ser Ile His
1 5 10

<210> 246
<211> 10
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Artificial clone 58CDRL3 ligante de HER2 sintético

<400> 246

Gly Phe Tyr Ile Ser Ser Ser Ser Ile His
1 5 10

<210> 247
<211> 10
<212> PRT
<213> Artificial
<220>

<223> Artificial clone 59CDRL3 ligante de HER2 sintético

<400> 247

Gly Phe Tyr Ile Ser Ser Tyr Ser Ile His
1 5 10

<210> 248
<211> 10
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Artificial clone 60DRL3 ligante de HER2 sintético

<400> 248

Gly Phe Tyr Ile Ser Ser Ser Ser Ile His
1 5 10

<210> 249
<211> 10
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Artificial clone 61CDRL3 ligante de HER2 sintético

<400> 249

Gly Phe Tyr Ile Ser Ser Ser Ser Ile His
1 5 10

<210> 250
<211> 10
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Artificial clone 62CDRL3 ligante de HER2 sintético

<400> 250

Gly Phe Tyr Ile Ser Ser Ser Ser Ile His
1 5 10

<210> 251
<211> 10
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Artificial clone 63CDRL3 ligante de HER2 sintético

<400> 251

Gly Phe Tyr Ile Ser Ser Ser Ser Ile His
1 5 10

<210> 252
<211> 10
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Artificial clone 64CDRL3 ligante de HER2 sintético

<400> 252

Gly Phe Tyr Ile Ser Ser Tyr Ser Ile His
1 5 10

<210> 253
<211> 10
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Artificial clone 65CDRL3 ligante de HER2 sintético

<400> 253

Gly Phe Tyr Ile Ser Ser Ser Tyr Ile His
1 5 10

<210> 254
<211> 10
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Artificial clone 66CDRL3 ligante de HER2 sintético

<400> 254

Gly Phe Tyr Ile Ser Ser Ser Ser Ile His
1 5 10

<210> 255
<211> 10
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Artificial clone 67CDRL3 ligante de HER2 sintético

<400> 255

Gly Phe Tyr Ile Ser Ser Tyr Ser Ile His
1 5 10

<210> 256

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

<220>
<223> Artificial clone 68CDRL3 ligante de HER2 sintético

<400> 256

Gly Phe Ser Ile Tyr Tyr Ser Ser Ile His
1 5 10

<210> 257
<211> 10
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Artificial clone 69CDRL3 ligante de HER2 sintético

<400> 257

Gly Phe Tyr Ile Ser Ser Ser Ser Ile His
1 5 10

<210> 258
<211> 10
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Artificial clone 70CDRL3 ligante de HER2 sintético

<400> 258

Gly Phe Tyr Ile Ser Ser Ser Ser Ile His
1 5 10

<210> 259
<211> 10
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Artificial clone 71CDRL3 ligante de HER2 sintético

<400> 259

Gly Phe Tyr Ile Ser Ser Tyr Ser Ile His
1 5 10

<210> 260
<211> 10
<212> PRT
<213> Artificial
<220>

<223> Artificial clone 72CDRL3 ligante de HER2 sintético

<400> 260

Gly Phe Tyr Ile Ser Tyr Tyr Ser Ile His
1 5 10

<210> 261
<211> 10
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Artificial clone 73CDRL3 ligante de HER2 sintético

<400> 261

Gly Phe Tyr Ile Ser Tyr Tyr Ser Ile His
1 5 10

<210> 262
<211> 10
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Artificial clone 74CDRL3 ligante de HER2 sintético

<400> 262

Gly Phe Tyr Ile Ser Ser Ser Ser Ile His
1 5 10

<210> 263
<211> 10
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Artificial clone 75CDRL3 ligante de HER2 sintético

<400> 263

Gly Phe Tyr Ile Ser Ser Ser Ser Ile His
1 5 10

<210> 264
<211> 10
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Artificial clone 76CDRL3 ligante de HER2 sintético

<400> 264

Gly Phe Tyr Ile Ser Ser Ser Ser Ile His
1 5 10

<210> 265
<211> 10
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Artificial clone 77CDRL3 ligante de HER2 sintético

<400> 265

Gly Phe Tyr Ile Ser Ser Ser Ser Ile His
1 5 10

<210> 266
<211> 10
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Artificial clone 78CDRL3 ligante de HER2 sintético

<400> 266

Gly Phe Tyr Ile Ser Ser Ser Ser Ile His
1 5 10

<210> 267
<211> 10
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Artificial clone 79CDRL3 ligante de HER2 sintético

<400> 267

Gly Phe Ser Ile Ser Ser Ser Ser Ile His
1 5 10

<210> 268
<211> 10
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Artificial clone 80CDRL3 ligante de HER2 sintético

<400> 268

Gly Phe Ser Ile Tyr Tyr Ser Ser Ile His
1 5 10

<210> 269

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

<220>
<223> Artificial clone 81CDRL3 ligante de HER2 sintético

<400> 269

Gly Phe Tyr Ile Ser Ser Ser Tyr Ile His
1 5 10

<210> 270
<211> 10
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Artificial clone 82CDRL3 ligante de HER2 sintético

<400> 270

Gly Phe Tyr Ile Ser Ser Ser Ser Ile His
1 5 10

<210> 271
<211> 10
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Artificial clone 83CDRL3 ligante de HER2 sintético

<400> 271

Gly Phe Tyr Ile Ser Ser Ser Ser Ile His
1 5 10

<210> 272
<211> 10
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Artificial clone 84CDRL3 ligante de HER2 sintético

<400> 272

Gly Phe Ser Ile Ser Ser Ser Ser Ile His
1 5 10

<210> 273
<211> 10
<212> PRT
<213> Artificial
<220>

<223> Artificial clone 85CDRL3 ligante de HER2 sintético

<400> 273

Gly Phe Ser Ile Ser Ser Ser Ser Ile His
1 5 10

<210> 274
<211> 10
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Artificial clone 86CDRL3 ligante de HER2 sintético

<400> 274

Gly Phe Ser Ile Ser Tyr Ser Ser Ile His
1 5 10

<210> 275
<211> 10
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Artificial clone 87CDRL3 ligante de HER2 sintético

<400> 275

Gly Phe Tyr Ile Ser Tyr Ser Ser Ile His
1 5 10

<210> 276
<211> 10
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Artificial clone 88CDRL3 ligante de HER2 sintético

<400> 276

Gly Phe Tyr Ile Ser Ser Ser Ser Ile His
1 5 10

<210> 277
<211> 10
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Artificial clone 89CDRL3 ligante de HER2 sintético

<400> 277

Gly Phe Ser Ile Ser Ser Ser Ser Ile His
1 5 10

<210> 278
<211> 10
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Artificial clone 90CDRL3 ligante de HER2 sintético

<400> 278

Gly Phe Tyr Ile Ser Ser Ser Ser Ile His
1 5 10

<210> 279
<211> 10
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Artificial clone 91CDRL3 ligante de HER2 sintético

<400> 279

Gly Phe Ser Ile Ser Ser Ser Ser Ile His
1 5 10

<210> 280
<211> 10
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Artificial clone 92CDRL3 ligante de HER2 sintético

<400> 280

Gly Phe Tyr Ile Ser Ser Ser Ser Ile His
1 5 10

<210> 281
<211> 10
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Artificial clone 93CDRL3 ligante de HER2 sintético

<400> 281

Gly Phe Tyr Ile Ser Ser Ser Ser Ile His
1 5 10

<210> 282

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

<220>
<223> Artificial clone 94CDRL3 ligante de HER2 sintético

<400> 282

Gly Phe Ser Ile Ser Ser Ser Tyr Ile His
1 5 10

<210> 283
<211> 10
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Artificial clone 95CDRL3 ligante de HER2 sintético

<400> 283

Gly Phe Phe Ile Ser Tyr Tyr Tyr Ile His
1 5 10

<210> 284
<211> 10
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Artificial clone 96CDRL3 ligante de HER2 sintético

<400> 284

Gly Phe Ser Ile Tyr Ser Ser Tyr Ile His
1 5 10

<210> 285
<211> 10
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Artificial clone 97CDRL3 ligante de HER2 sintético

<400> 285

Gly Phe Tyr Ile Ser Tyr Ser Ser Ile His
1 5 10

<210> 286
<211> 10
<212> PRT
<213> Artificial
<220>

<223> Artificial clone 98CDRL3 ligante de HER2 sintético

<400> 286

Gly Phe Tyr Ile Tyr Ser Tyr Ser Ile His
1 5 10

<210> 287
<211> 10
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Artificial clone 99CDRL3 ligante de HER2 sintético

<400> 287

Gly Phe Tyr Ile Ser Tyr Ser Ser Ile His
1 5 10

<210> 288
<211> 10
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Artificial clone 100CDRL3 ligante de HER2 sintético

<400> 288

Gly Phe Ser Ile Ser Tyr Ser Ser Ile His
1 5 10

<210> 289
<211> 10
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Artificial clone 101CDRL3 ligante de HER2 sintético

<400> 289

Gly Phe Ser Ile Ser Tyr Ser Ser Ile His
1 5 10

<210> 290
<211> 10
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Artificial clone 102CDRL3 ligante de HER2 sintético

<400> 290

Gly Phe Tyr Ile Ser Tyr Ser Ser Ile His
1 5 10

<210> 291
<211> 10
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Artificial clone 103CDRL3 ligante de HER2 sintético

<400> 291

Gly Phe Ser Ile Ser Tyr Ser Ser Ile His
1 5 10

<210> 292
<211> 10
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Artificial clone 104CDRL3 ligante de HER2 sintético

<400> 292

Gly Phe Ser Ile Ser Tyr Ser Tyr Ile His
1 5 10

<210> 293
<211> 10
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Artificial clone 105CDRL3 ligante de HER2 sintético

<400> 293

Gly Phe Ser Ile Ser Tyr Ser Tyr Ile His
1 5 10

<210> 294
<211> 10
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Artificial clone 106CDRL3 ligante de HER2 sintético

<400> 294

Gly Phe Tyr Ile Ser Tyr Ser Tyr Ile His
1 5 10

<210> 295

<211> 17
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Artificial clone 1CDHR2 ligante de HER2 sintético

<400> 295

Ser Ile Tyr Pro Tyr Ser Gly Tyr Thr Ser Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 296
<211> 17
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Artificial clone 2CDHR2 ligante de HER2 sintético

<400> 296

Ser Ile Tyr Pro Tyr Ser Gly Tyr Thr Ser Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 297
<211> 17
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Artificial clone 3CDHR2 ligante de HER2 sintético

<400> 297

Ser Ile Tyr Pro Tyr Ser Gly Tyr Thr Ser Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 298
<211> 17
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Artificial clone 4CDHR2 ligante de HER2 sintético

<400> 298
Ser Ile Tyr Pro Tyr Ser Gly Tyr Thr Ser Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 299
<211> 17
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Artificial clone 5CDHR2 ligante de HER2 sintético

<400> 299

Ser Ile Tyr Pro Tyr Ser Gly Tyr Thr Ser Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 300
<211> 17
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Artificial clone 6CDHR2 ligante de HER2 sintético

<400> 300

Ser Ile Tyr Pro Ser Ser Gly Tyr Thr Ser Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 301
<211> 17
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Artificial clone 7CDHR2 ligante de HER2 sintético

<400> 301

Ser Ile Tyr Pro Ser Ser Gly Tyr Thr Ser Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 302
<211> 17
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Artificial clone 8CDHR2 ligante de HER2 sintético

<400> 302

Ser Ile Tyr Pro Ser Ser Gly Tyr Thr Ser Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 303
<211> 17
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Artificial clone 9CDHR2 ligante de HER2 sintético

<400> 303

Ser Ile Tyr Pro Tyr Ser Gly Tyr Thr Ser Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 304
<211> 17
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Artificial clone 10CDHR2 ligante de HER2 sintético

<400> 304

Ser Ile Tyr Pro Tyr Ser Gly Tyr Thr Ser Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 305
<211> 17
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Artificial clone 11CDHR2 ligante de HER2 sintético

<400> 305

Ser Ile Tyr Pro Ser Ser Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 306
<211> 17
<212> PRT
<213> Artificial

<220>

<223> Artificial clone 12CDHR2 ligante de HER2 sintético

<400> 306

Ser Ile Tyr Pro Tyr Ser Gly Ser Thr Ser Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 307
<211> 17
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Artificial clone 13CDHR2 ligante de HER2 sintético

<400> 307

Ser Ile Tyr Pro Tyr Tyr Gly Tyr Thr Ser Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 308
<211> 17
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Artificial clone 14CDHR2 ligante de HER2 sintético

<400> 308

Ser Ile Tyr Pro Tyr Tyr Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 309
<211> 17
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Artificial clone 15CDHR2 ligante de HER2 sintético

<400> 309

Ser Ile Tyr Pro Tyr Tyr Gly Tyr Thr Ser Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 310
<211> 17

<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Artificial clone 16CDHR2 ligante de HER2 sintético

<400> 310

Ser Ile Tyr Pro Ser Tyr Gly Tyr Thr Ser Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 311
<211> 17
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Artificial clone 17CDHR2 ligante de HER2 sintético

<400> 311

Ser Ile Tyr Pro Tyr Tyr Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 312
<211> 17
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Artificial clone 18CDHR2 ligante de HER2 sintético

<400> 312

Ser Ile Tyr Pro Tyr Tyr Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 313
<211> 17
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Artificial clone 19CDHR2 ligante de HER2 sintético

<400> 313

Ser Ile Tyr Pro Tyr Tyr Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 314
<211> 17
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Artificial clone 20CDHR2 ligante de HER2 sintético

<400> 314

Ser Ile Tyr Pro Tyr Tyr Gly Tyr Thr Ser Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 315
<211> 17
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Artificial clone 21CDHR2 ligante de HER2 sintético

<400> 315

Ser Ile Tyr Pro Tyr Tyr Gly Tyr Thr Ser Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 316
<211> 17
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Artificial clone 22CDHR2 ligante de HER2 sintético

<400> 316

Ser Ile Tyr Pro Tyr Tyr Gly Tyr Thr Ser Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 317
<211> 17
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Artificial clone 23CDHR2 ligante de HER2 sintético

<400> 317

Ser Ile Tyr Pro Ser Tyr Gly Tyr Thr Ser Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 318
<211> 17
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Artificial clone 24CDHR2 ligante de HER2 sintético

<400> 318

Ser Ile Tyr Pro Tyr Tyr Gly Tyr Thr Ser Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 319
<211> 17
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Artificial clone 25CDHR2 ligante de HER2 sintético

<400> 319

Ser Ile Tyr Pro Tyr Tyr Gly Tyr Thr Ser Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 320
<211> 17
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Artificial clone 26CDHR2 ligante de HER2 sintético

<400> 320

Ser Ile Tyr Pro Tyr Tyr Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 321
<211> 17
<212> PRT
<213> Artificial

<220>

<223> Artificial clone 27CDHR2 ligante de HER2 sintético

<400> 321

Ser Ile Tyr Pro Tyr Tyr Gly Tyr Thr Ser Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 322
<211> 17
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Artificial clone 28CDHR2 ligante de HER2 sintético

<400> 322

Ser Ile Tyr Pro Ser Tyr Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 323
<211> 17
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Artificial clone 29CDHR2 ligante de HER2 sintético

<400> 323

Tyr Ile Tyr Pro Ser Ser Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 324
<211> 17
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Artificial clone 30CDHR2 ligante de HER2 sintético

<400> 324

Ser Ile Ser Pro Tyr Tyr Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 325
<211> 17

<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Artificial clone 31CDHR2 ligante de HER2 sintético

<400> 325

Ser Ile Ser Pro Tyr Ser Gly Ser Thr Ser Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 326
<211> 17
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Artificial clone 32CDHR2 ligante de HER2 sintético

<400> 326

Ser Ile Ser Pro Tyr Ser Gly Tyr Thr Ser Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 327
<211> 17
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Artificial clone 33CDHR2 ligante de HER2 sintético

<400> 327

Tyr Ile Ser Pro Ser Ser Gly Tyr Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 328
<211> 17
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Artificial clone 34CDHR2 ligante de HER2 sintético

<400> 328

Ser Ile Tyr Pro Ser Ser Gly Tyr Thr Ser Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 329
<211> 17
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Artificial clone 35CDHR2 ligante de HER2 sintético

<400> 329

Ser Ile Tyr Pro Ser Ser Gly Tyr Thr Ser Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 330
<211> 17
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Artificial clone 36CDHR2 ligante de HER2 sintético

<400> 330

Ser Ile Ser Pro Ser Ser Gly Tyr Thr Ser Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 331
<211> 17
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Artificial clone 37CDHR2 ligante de HER2 sintético

<400> 331

Ser Ile Tyr Pro Ser Ser Gly Tyr Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 332
<211> 17
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Artificial clone 38CDHR2 ligante de HER2 sintético

<400> 332

Ser Ile Tyr Pro Ser Ser Gly Tyr Thr Ser Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 333
<211> 17
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Artificial clone 39CDHR2 ligante de HER2 sintético

<400> 333

Ser Ile Tyr Pro Ser Ser Gly Tyr Thr Ser Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 334
<211> 17
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Artificial clone 40CDHR2 ligante de HER2 sintético

<400> 334

Tyr Ile Tyr Pro Ser Ser Gly Tyr Thr Ser Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 335
<211> 17
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Artificial clone 41CDHR2 ligante de HER2 sintético

<400> 335

Ser Ile Tyr Pro Ser Ser Gly Tyr Thr Ser Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 336
<211> 17
<212> PRT
<213> Artificial

<220>

<223> Artificial clone 42CDHR2 ligante de HER2 sintético

<400> 336

Tyr Ile Tyr Pro Ser Ser Gly Tyr Thr Ser Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 337
<211> 17
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Artificial clone 43CDHR2 ligante de HER2 sintético

<400> 337

Tyr Ile Ser Pro Tyr Ser Gly Tyr Thr Ser Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 338
<211> 17
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Artificial clone 44CDHR2 ligante de HER2 sintético

<400> 338

Ser Ile Tyr Pro Ser Ser Gly Tyr Thr Ser Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 339
<211> 17
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Artificial clone 45CDHR2 ligante de HER2 sintético

<400> 339

Ser Ile Tyr Pro Ser Ser Gly Ser Thr Ser Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 340
<211> 17
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Artificial clone 46CDHR2 ligante de HER2 sintético

<400> 340

Tyr Ile Ser Pro Ser Ser Gly Tyr Thr Ser Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 341
<211> 17
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Artificial clone 47CDHR2 ligante de HER2 sintético

<400> 341

Ser Ile Tyr Pro Ser Ser Gly Tyr Thr Ser Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 342
<211> 17
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Artificial clone 48CDHR2 ligante de HER2 sintético

<400> 342

Ser Ile Ser Pro Ser Ser Gly Tyr Thr Ser Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 343
<211> 17
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Artificial clone 49CDHR2 ligante de HER2 sintético

<400> 343

Ser Ile Tyr Pro Ser Ser Gly Tyr Thr Ser Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 344
<211> 17
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Artificial clone 50CDHR2 ligante de HER2 sintético

<400> 344

Ser Ile Tyr Pro Ser Ser Gly Tyr Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 345
<211> 17
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Artificial clone 51CDHR2 ligante de HER2 sintético

<400> 345

Tyr Ile Tyr Pro Ser Ser Gly Tyr Thr Ser Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 346
<211> 17
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Artificial clone 52CDHR2 ligante de HER2 sintético

<400> 346

Ser Ile Tyr Pro Ser Tyr Gly Tyr Thr Ser Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 347
<211> 17
<212> PRT
<213> Artificial

<220>

<223> Artificial clone 53CDHR2 ligante de HER2 sintético

<400> 347

Tyr Ile Tyr Pro Ser Ser Gly Ser Thr Ser Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 348
<211> 17
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Artificial clone 54CDHR2 ligante de HER2 sintético

<400> 348

Ser Ile Tyr Pro Ser Ser Gly Tyr Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 349
<211> 17
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Artificial clone 55CDHR2 ligante de HER2 sintético

<400> 349

Ser Ile Tyr Pro Ser Ser Gly Tyr Thr Ser Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 350
<211> 17
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Artificial clone 56CDHR2 ligante de HER2 sintético

<400> 350

Ser Ile Tyr Pro Ser Ser Gly Ser Thr Ser Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 351
<211> 17

<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Artificial clone 57CDHR2 ligante de HER2 sintético

<400> 351

Ser Ile Ser Pro Ser Ser Gly Tyr Thr Ser Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 352
<211> 17
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Artificial clone 58CDHR2 ligante de HER2 sintético

<400> 352

Tyr Ile Tyr Pro Ser Ser Gly Tyr Thr Ser Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 353
<211> 17
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Artificial clone 59CDHR2 ligante de HER2 sintético

<400> 353

Ser Ile Tyr Pro Ser Ser Gly Tyr Thr Ser Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 354
<211> 17
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Artificial clone 60CDHR2 ligante de HER2 sintético

<400> 354

Tyr Ile Ser Pro Ser Ser Gly Tyr Thr Ser Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 355
<211> 17
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Artificial clone 61CDHR2 ligante de HER2 sintético

<400> 355

Ser Ile Tyr Pro Ser Ser Gly Tyr Thr Ser Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 356
<211> 17
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Artificial clone 62CDHR2 ligante de HER2 sintético

<400> 356

Tyr Ile Tyr Pro Ser Ser Gly Tyr Thr Ser Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 357
<211> 17
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Artificial clone 63CDHR2 ligante de HER2 sintético

<400> 357

Tyr Ile Tyr Pro Ser Ser Gly Tyr Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 358
<211> 17
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Artificial clone 64CDHR2 ligante de HER2 sintético

<400> 358

Ser Ile Tyr Pro Ser Ser Gly Ser Thr Ser Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 359
<211> 17
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Artificial clone 65CDHR2 ligante de HER2 sintético

<400> 359

Ser Ile Ser Pro Ser Ser Gly Tyr Thr Ser Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 360
<211> 17
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Artificial clone 66CDHR2 ligante de HER2 sintético

<400> 360

Ser Ile Tyr Pro Ser Ser Gly Tyr Thr Ser Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 361
<211> 17
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Artificial clone 67CDHR2 ligante de HER2 sintético

<400> 361

Tyr Ile Ser Pro Ser Ser Gly Tyr Thr Ser Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 362
<211> 17
<212> PRT
<213> Artificial

<220>

<223> Artificial clone 68CDHR2 ligante de HER2 sintético

<400> 362

Ser Ile Ser Pro Tyr Ser Gly Ser Thr Ser Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 363
<211> 17
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Artificial clone 69CDHR2 ligante de HER2 sintético

<400> 363

Tyr Ile Tyr Pro Ser Ser Gly Tyr Thr Ser Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 364
<211> 17
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Artificial clone 70CDHR2 ligante de HER2 sintético

<400> 364

Ser Ile Tyr Pro Tyr Ser Gly Ser Thr Ser Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 365
<211> 17
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Artificial clone 71CDHR2 ligante de HER2 sintético

<400> 365

Ser Ile Ser Pro Tyr Ser Gly Tyr Thr Ser Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 366
<211> 17

<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Artificial clone 72CDHR2 ligante de HER2 sintético

<400> 366

Ser Ile Ser Pro Ser Ser Gly Tyr Thr Ser Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 367
<211> 17
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Artificial clone 73CDHR2 ligante de HER2 sintético

<400> 367

Ser Ile Ser Pro Tyr Ser Gly Tyr Thr Ser Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 368
<211> 17
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Artificial clone 74CDHR2 ligante de HER2 sintético

<400> 368

Ser Ile Tyr Pro Ser Ser Gly Tyr Thr Ser Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 369
<211> 17
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Artificial clone 75CDHR2 ligante de HER2 sintético

<400> 369

Ser Ile Tyr Pro Tyr Tyr Gly Ser Thr Ser Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 370
<211> 17
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Artificial clone 76CDHR2 ligante de HER2 sintético

<400> 370

Tyr Ile Tyr Pro Ser Ser Gly Ser Thr Ser Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 371
<211> 17
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Artificial clone 77CDHR2 ligante de HER2 sintético

<400> 371

Tyr Ile Ser Pro Ser Ser Gly Tyr Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 372
<211> 17
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Artificial clone 78CDHR2 ligante de HER2 sintético

<400> 372

Ser Ile Ser Pro Ser Ser Gly Ser Thr Ser Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 373
<211> 17
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Artificial clone 79CDHR2 ligante de HER2 sintético

<400> 373

Ser Ile Ser Pro Ser Ser Gly Tyr Thr Ser Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 374
<211> 17
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Artificial clone 80CDHR2 ligante de HER2 sintético

<400> 374

Ser Ile Tyr Pro Tyr Ser Gly Ser Thr Ser Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 375
<211> 17
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Artificial clone 81CDHR2 ligante de HER2 sintético

<400> 375

Tyr Ile Ser Pro Ser Ser Gly Tyr Thr Ser Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 376
<211> 17
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Artificial clone 82CDHR2 ligante de HER2 sintético

<400> 376

Tyr Ile Ser Pro Ser Ser Gly Tyr Thr Ser Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 377
<211> 17
<212> PRT
<213> Artificial

<220>

<223> Artificial clone 83CDHR2 ligante de HER2 sintético

<400> 377

Ser Ile Ser Pro Ser Ser Gly Tyr Thr Ser Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 378
<211> 17
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Artificial clone 84CDHR2 ligante de HER2 sintético

<400> 378

Tyr Ile Ser Pro Tyr Ser Gly Tyr Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 379
<211> 17
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Artificial clone 85CDHR2 ligante de HER2 sintético

<400> 379

Tyr Ile Ser Pro Tyr Ser Gly Tyr Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 380
<211> 17
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Artificial clone 86CDHR2 ligante de HER2 sintético

<400> 380

Tyr Ile Tyr Pro Tyr Ser Gly Ser Thr Ser Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 381
<211> 17

<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Artificial clone 87CDHR2 ligante de HER2 sintético

<400> 381

Ser Ile Ser Pro Ser Tyr Gly Tyr Thr Ser Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 382
<211> 17
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Artificial clone 88CDHR2 ligante de HER2 sintético

<400> 382

Ser Ile Ser Pro Ser Tyr Gly Tyr Thr Ser Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 383
<211> 17
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Artificial clone 89CDHR2 ligante de HER2 sintético

<400> 383

Ser Ile Tyr Pro Tyr Ser Gly Tyr Thr Ser Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 384
<211> 17
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Artificial clone 90CDHR2 ligante de HER2 sintético

<400> 384

Ser Ile Ser Pro Tyr Ser Gly Tyr Thr Ser Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 385
<211> 17
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Artificial clone 91CDHR2 ligante de HER2 sintético

<400> 385

Tyr Ile Tyr Pro Tyr Ser Gly Tyr Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 386
<211> 17
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Artificial clone 92CDHR2 ligante de HER2 sintético

<400> 386

Tyr Ile Ser Pro Ser Ser Gly Tyr Thr Ser Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 387
<211> 17
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Artificial clone 93CDHR2 ligante de HER2 sintético

<400> 387

Tyr Ile Ser Pro Ser Ser Gly Tyr Thr Ser Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 388
<211> 17
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Artificial clone 94CDHR2 ligante de HER2 sintético

<400> 388

Tyr Ile Ser Pro Ser Tyr Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 389
<211> 17
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Artificial clone 95CDHR2 ligante de HER2 sintético

<400> 389

Ser Ile Ser Pro Ser Ser Gly Tyr Thr Ser Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 390
<211> 17
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Artificial clone 96CDHR2 ligante de HER2 sintético

<400> 390

Ser Ile Tyr Pro Tyr Ser Gly Tyr Thr Ser Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 391
<211> 17
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Artificial clone 97CDHR2 ligante de HER2 sintético

<400> 391

Ser Ile Tyr Pro Tyr Tyr Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 392
<211> 17
<212> PRT
<213> Artificial

<220>

<223> Artificial clone 98CDHR2 ligante de HER2 sintético

<400> 392

Ser Ile Tyr Pro Tyr Tyr Gly Tyr Thr Ser Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 393
<211> 17
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Artificial clone 99CDHR2 ligante de HER2 sintético

<400> 393

Ser Ile Tyr Pro Tyr Tyr Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 394
<211> 17
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Artificial clone 100CDHR2 ligante de HER2 sintético

<400> 394

Ser Ile Tyr Pro Tyr Tyr Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 395
<211> 17
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Artificial clone 101CDHR2 ligante de HER2 sintético

<400> 395

Ser Ile Tyr Pro Ser Tyr Gly Tyr Thr Ser Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 396
<211> 17

<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Artificial clone 102CDHR2 ligante de HER2 sintético

<400> 396

Ser Ile Tyr Pro Tyr Tyr Gly Tyr Thr Ser Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 397
<211> 17
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Artificial clone 103CDHR2 ligante de HER2 sintético

<400> 397

Ser Ile Tyr Pro Tyr Tyr Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 398
<211> 17
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Artificial clone 104CDHR2 ligante de HER2 sintético

<400> 398

Ser Ile Tyr Pro Ser Ser Gly Tyr Thr Ser Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 399
<211> 17
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Artificial clone 105CDHR2 ligante de HER2 sintético

<400> 399

Ser Ile Tyr Pro Ser Ser Gly Tyr Thr Ser Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 400
<211> 17
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Artificial clone 106CDHR2 ligante de HER2 sintético

<400> 400

Ser Ile Tyr Pro Ser Ser Gly Tyr Thr Ser Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 401
<211> 8
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Artificial clone 106CDHR2 ligante de HER2 sintético

<400> 401

Tyr Tyr Ser Ser Gly Phe Asp Tyr
1 5

<210> 402
<211> 8
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Artificial clone 1CDHR3 ligante de HER2 sintético

<400> 402

Tyr Tyr Gly Tyr Gly Met Asp Tyr
1 5

<210> 403
<211> 8
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Artificial clone 3CDHR3 ligante de HER2 sintético

<400> 403

Tyr Tyr Gly Tyr Gly Leu Asp Tyr
1 5

<210> 404
<211> 8
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Artificial clone 4CDHR3 ligante de HER2 sintético

<400> 404

Tyr Tyr Gly Tyr Gly Phe Asp Tyr
1 5

<210> 405
<211> 8
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Artificial clone 5CDHR3 ligante de HER2 sintético

<400> 405

Tyr Tyr Gly Ser Gly Phe Asp Tyr
1 5

<210> 406
<211> 8
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Artificial clone 6CDHR3 ligante de HER2 sintético

<400> 406

Tyr Tyr Gly Gly Ala Phe Asp Tyr
1 5

<210> 407
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Artificial clone 7CDHR3 ligante de HER2 sintético

<400> 407

Tyr Tyr Gly Arg Gly Ala Met Asp Tyr
1 5

<210> 408
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Artificial clone 8CDHR3 ligante de HER2 sintético

<400> 408

Tyr Ser Tyr Ser Gly Ala Leu Asp Tyr
1 5

<210> 409
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Artificial clone 9CDHR3 ligante de HER2 sintético

<400> 409

Tyr Arg Tyr Tyr Gly Ala Leu Asp Tyr
1 5

<210> 410
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Artificial clone 10CDHR3 ligante de HER2 sintético

<400> 410

Tyr Arg Tyr Gly Gly Ala Met Asp Tyr
1 5

<210> 411
<211> 10
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Artificial clone 11CDHR3 ligante de HER2 sintético

<400> 411

Tyr Tyr Gly Gly Tyr Tyr Gly Met Asp Tyr
1 5 10

<210> 412
<211> 10
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Artificial clone 12CDHR3 ligante de HER2 sintético

<400> 412

Tyr Ser Tyr Tyr Tyr Tyr Ala Leu Asp Tyr
1 5 10

<210> 413
<211> 10
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Artificial clone 13CDHR3 ligante de HER2 sintético

<400> 413

Ser Ser Tyr Tyr Tyr Tyr Gly Met Asp Tyr
1 5 10

<210> 414
<211> 10
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Artificial clone 14CDHR3 ligante de HER2 sintético

<400> 414

Ser Ser Tyr Tyr Tyr Tyr Gly Phe Asp Tyr
1 5 10

<210> 415
<211> 10
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Artificial clone 15CDHR3 ligante de HER2 sintético

<400> 415

Ser Ser Tyr Tyr Tyr Tyr Gly Leu Asp Tyr
1 5 10

<210> 416
<211> 10
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Artificial clone 16CDHR3 ligante de HER2 sintético

<400> 416

Ser Gly Gly Tyr Ser Arg Gly Ile Asp Tyr
1 5 10

<210> 417
<211> 10
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Artificial clone 17CDHR3 ligante de HER2 sintético

<400> 417

Gly Tyr Ser Tyr Ser Arg Gly Ile Asp Tyr
1 5 10

<210> 418
<211> 10
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Artificial clone 18CDHR3 ligante de HER2 sintético

<400> 418

Gly Tyr Ser Tyr Ser Arg Gly Met Asp Tyr
1 5 10

<210> 419
<211> 10
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Artificial clone 19CDHR3 ligante de HER2 sintético

<400> 419

Gly Ser Ser Tyr Ser Tyr Gly Met Asp Tyr
1 5 10

<210> 420
<211> 10
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Artificial clone 20CDHR3 ligante de HER2 sintético

<400> 420

Gly Ser Gly Tyr Gly Tyr Gly Met Asp Tyr
1 5 10

<210> 421
<211> 10
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Artificial clone 21CDHR3 ligante de HER2 sintético

<400> 421

Gly Ser Gly Tyr Gly Tyr Gly Ile Asp Tyr
1 5 10

<210> 422
<211> 10
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Artificial clone 22CDHR3 ligante de HER2 sintético

<400> 422

Gly Arg Arg Tyr Ser Arg Gly Ile Asp Tyr
1 5 10

<210> 423
<211> 10
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Artificial clone 23CDHR3 ligante de HER2 sintético

<400> 423

Gly Gly Ser Tyr Gly Tyr Gly Met Asp Tyr
1 5 10

<210> 424
<211> 10
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Artificial clone 24CDHR3 ligante de HER2 sintético

<400> 424

Gly Gly Ser Tyr Gly Tyr Gly Met Asp Tyr
1 5 10

<210> 425
<211> 10
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Artificial clone 25CDHR3 ligante de HER2 sintético

<400> 425

Gly Gly Arg Tyr Gly Tyr Gly Leu Asp Tyr
1 5 10

<210> 426
<211> 10
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Artificial clone 26CDHR3 ligante de HER2 sintético

<400> 426

Gly Gly Arg Tyr Gly Arg Gly Ile Asp Tyr
1 5 10

<210> 427
<211> 10
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Artificial clone 27CDHR3 ligante de HER2 sintético

<400> 427

Gly Gly Gly Tyr Gly Tyr Gly Ile Asp Tyr
1 5 10

<210> 428
<211> 10
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Artificial clone 28CDHR3 ligante de HER2 sintético

<400> 428

Gly Gly Gly Tyr Gly Tyr Gly Ile Asp Tyr
1 5 10

<210> 429
<211> 12
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Artificial clone 29CDHR3 ligante de HER2 sintético

<400> 429

Tyr Tyr Tyr Ser Gly Gly Ser Tyr Gly Met Asp Tyr
1 5 10

<210> 430

<211> 12
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Artificial clone 30CDHR3 ligante de HER2 sintético

<400> 430

Ser Tyr Ser Ser Tyr Tyr Ser Ser Gly Met Asp Tyr
1 5 10

<210> 431
<211> 12
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Artificial clone 31CDHR3 ligante de HER2 sintético

<400> 431

Arg Tyr Tyr Tyr Tyr Tyr Tyr Ser Ala Phe Asp Tyr
1 5 10

<210> 432
<211> 14
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Artificial clone 32CDHR3 ligante de HER2 sintético

<400> 432

Tyr Tyr Tyr Tyr Ser Tyr Tyr Ser Gly Gly Ala Ile Asp Tyr
1 5 10

<210> 433
<211> 14
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Artificial clone 33CDHR3 ligante de HER2 sintético

<400> 433

Ser Tyr Tyr Tyr Ser Tyr Tyr Ser Gly Tyr Gly Met Asp Tyr
1 5 10

<210> 434
<211> 14
<212> PRT
<213> Artificial
<220>

<223> Artificial clone 34CDHR3 ligante de HER2 sintético

<400> 434

Ser Tyr Tyr Tyr Ser Tyr Tyr Ser Gly Tyr Gly Leu Asp Tyr
1 5 10

<210> 435
<211> 14
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Artificial clone 35CDHR3 ligante de HER2 sintético

<400> 435

Ser Tyr Tyr Tyr Ser Tyr Tyr Tyr Gly Tyr Gly Met Asp Tyr
1 5 10

<210> 436
<211> 14
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Artificial clone 36CDHR3 ligante de HER2 sintético

<400> 436

Ser Tyr Tyr Gly Ser Tyr Tyr Tyr Gly Tyr Gly Phe Asp Tyr
1 5 10

<210> 437
<211> 14
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Artificial clone 37CDHR3 ligante de HER2 sintético

<400> 437

Ser Ser Tyr Tyr Gly Tyr Tyr Ser Gly Tyr Gly Ile Asp Tyr
1 5 10

<210> 438
<211> 14
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Artificial clone 38CDHR3 ligante de HER2 sintético

<400> 438

Ser Ser Tyr Tyr Ser Tyr Tyr Ser Gly Tyr Gly Leu Asp Tyr
1 5 10

<210> 439
<211> 14
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Artificial clone 39CDHR3 ligante de HER2 sintético

<400> 439

Gly Tyr Tyr Tyr Ser Tyr Tyr Tyr Gly Tyr Gly Met Asp Tyr
1 5 10

<210> 440
<211> 14
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Artificial clone 40CDHR3 ligante de HER2 sintético

<400> 440

Gly Tyr Tyr Tyr Ser Tyr Tyr Tyr Gly Ser Ala Met Asp Tyr
1 5 10

<210> 441
<211> 14
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Artificial clone 41CDHR3 ligante de HER2 sintético

<400> 441

Gly Tyr Tyr Tyr Ser Tyr Tyr Ser Gly Tyr Gly Met Asp Tyr
1 5 10

<210> 442
<211> 14
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Artificial clone 42CDHR3 ligante de HER2 sintético

<400> 442

Gly Tyr Tyr Tyr Ser Tyr Tyr Ser Gly Tyr Ala Leu Asp Tyr
1 5 10

<210> 443

<211> 14
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Artificial clone 43CDHR3 ligante de HER2 sintético

<400> 443

Gly Tyr Tyr Tyr Ser Tyr Tyr Ser Gly Tyr Ala Ile Asp Tyr
1 5 10

<210> 444
<211> 14
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Artificial clone 44CDHR3 ligante de HER2 sintético

<400> 444

Gly Tyr Tyr Tyr Ser Tyr Tyr Ser Gly Tyr Ala Met Asp Tyr
1 5 10

<210> 445
<211> 14
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Artificial clone 45CDHR3 ligante de HER2 sintético

<400> 445

Gly Tyr Tyr Tyr Ser Tyr Tyr Ser Gly Tyr Gly Ile Asp Tyr
1 5 10

<210> 446
<211> 14
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Artificial clone 46CDHR3 ligante de HER2 sintético

<400> 446

Gly Tyr Tyr Tyr Ser Tyr Tyr Ser Gly Tyr Gly Leu Asp Tyr
1 5 10

<210> 447
<211> 14
<212> PRT
<213> Artificial
<220>

<223> Artificial clone 47CDHR3 ligante de HER2 sintético

<400> 447

Gly Tyr Tyr Tyr Ser Tyr Tyr Ser Gly Tyr Gly Met Asp Tyr
1 5 10

<210> 448
<211> 14
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Artificial clone 48CDHR3 ligante de HER2 sintético

<400> 448

Gly Tyr Tyr Tyr Ser Tyr Tyr Ser Gly Ser Gly Leu Asp Tyr
1 5 10

<210> 449
<211> 14
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Artificial clone 49CDHR3 ligante de HER2 sintético

<400> 449

Gly Tyr Tyr Tyr Ser Tyr Tyr Gly Gly Tyr Gly Met Asp Tyr
1 5 10

<210> 450
<211> 14
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Artificial clone 50CDHR3 ligante de HER2 sintético

<400> 450

Gly Tyr Tyr Tyr Ser Tyr Tyr Gly Gly Tyr Gly Ile Asp Tyr
1 5 10

<210> 451
<211> 14
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Artificial clone 51CDHR3 ligante de HER2 sintético

<400> 451

Gly Tyr Tyr Tyr Ser Tyr Tyr Gly Gly Tyr Gly Met Asp Tyr
1 5 10

<210> 452
<211> 14
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Artificial clone 52CDHR3 ligante de HER2 sintético

<400> 452

Gly Tyr Tyr Tyr Ser Tyr Tyr Gly Gly Tyr Gly Met Asp Tyr
1 5 10

<210> 453
<211> 14
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Artificial clone 53CDHR3 ligante de HER2 sintético

<400> 453

Gly Tyr Tyr Tyr Ser Tyr Tyr Gly Gly Tyr Gly Met Asp Tyr
1 5 10

<210> 454
<211> 14
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Artificial clone 54CDHR3 ligante de HER2 sintético

<400> 454

Gly Tyr Tyr Tyr Ser Tyr Tyr Gly Gly Tyr Gly Leu Asp Tyr
1 5 10

<210> 455
<211> 14
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Artificial clone 55CDHR3 ligante de HER2 sintético

<400> 455

Gly Tyr Tyr Tyr Ser Tyr Tyr Gly Gly Tyr Gly Met Asp Tyr
1 5 10

<210> 456

<211> 14
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Artificial clone 56CDHR3 ligante de HER2 sintético

<400> 456

Gly Tyr Tyr Tyr Ser Tyr Tyr Gly Gly Tyr Gly Met Asp Tyr
1 5 10

<210> 457
<211> 14
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Artificial clone 57CDHR3 ligante de HER2 sintético

<400> 457

Gly Tyr Tyr Tyr Gly Tyr Tyr Ser Gly Tyr Gly Ile Asp Tyr
1 5 10

<210> 458
<211> 14
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Artificial clone 58CDHR3 ligante de HER2 sintético

<400> 458

Gly Ser Tyr Tyr Ser Tyr Tyr Ser Gly Tyr Gly Met Asp Tyr
1 5 10

<210> 459
<211> 14
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Artificial clone 59CDHR3 ligante de HER2 sintético

<400> 459

Gly Ser Tyr Tyr Ser Tyr Tyr Ser Gly Tyr Ala Ile Asp Tyr
1 5 10

<210> 460
<211> 14
<212> PRT
<213> Artificial
<220>

<223> Artificial clone 60CDHR3 ligante de HER2 sintético

<400> 460

Gly Ser Tyr Tyr Ser Tyr Tyr Ser Gly Tyr Ala Phe Asp Tyr
1 5 10

<210> 461
<211> 14
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Artificial clone 61CDHR3 ligante de HER2 sintético

<400> 461

Gly Ser Tyr Tyr Ser Tyr Tyr Ser Gly Ser Gly Ile Asp Tyr
1 5 10

<210> 462
<211> 14
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Artificial clone 62CDHR3 ligante de HER2 sintético

<400> 462

Gly Ser Tyr Tyr Gly Tyr Tyr Tyr Gly Ser Ala Ile Asp Tyr
1 5 10

<210> 463
<211> 14
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Artificial clone 63CDHR3 ligante de HER2 sintético

<400> 463

Gly Ser Tyr Tyr Gly Tyr Tyr Tyr Gly Ser Gly Met Asp Tyr
1 5 10

<210> 464
<211> 14
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Artificial clone 64CDHR3 ligante de HER2 sintético

<400> 464

Gly Ser Tyr Tyr Gly Tyr Tyr Ser Gly Ser Gly Met Asp Tyr
1 5 10

<210> 465
<211> 14
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Artificial clone 65CDHR3 ligante de HER2 sintético

<400> 465

Gly Ser Gly Tyr Ser Tyr Tyr Gly Gly Tyr Gly Leu Asp Tyr
1 5 10

<210> 466
<211> 14
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Artificial clone 66CDHR3 ligante de HER2 sintético

<400> 466

Gly Ser Tyr Ser Gly Tyr Tyr Tyr Gly Tyr Gly Leu Asp Tyr
1 5 10

<210> 467
<211> 14
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Artificial clone 67CDHR3 ligante de HER2 sintético

<400> 467

Gly Arg Tyr Ser Gly Tyr Tyr Gly Gly Tyr Gly Met Asp Tyr
1 5 10

<210> 468
<211> 15
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Artificial clone 68CDHR3 ligante de HER2 sintético

<400> 468

Tyr Tyr Tyr Ser Ser Gly Tyr Tyr Tyr Tyr Tyr Ala Phe Asp Tyr
1 5 10 15

<210> 469

<211> 15
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Artificial clone 69CDHR3 ligante de HER2 sintético

<400> 469

Tyr Ser Tyr Ser Tyr Tyr Gly Tyr Tyr Gly Ser Gly Met Asp Tyr
1 5 10 15

<210> 470
<211> 15
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Artificial clone 70CDHR3 ligante de HER2 sintético

<400> 470

Tyr Arg Ser Tyr Tyr Ser Tyr Arg Tyr Gly Tyr Gly Met Asp Tyr
1 5 10 15

<210> 471
<211> 15
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Artificial clone 71CDHR3 ligante de HER2 sintético

<400> 471

Tyr Gly Tyr Tyr Tyr Ser Tyr Tyr Gly Gly Ser Gly Leu Asp Tyr
1 5 10 15

<210> 472
<211> 15
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Artificial clone 72CDHR3 ligante de HER2 sintético

<400> 472

Tyr Gly Tyr Tyr Tyr Ser Tyr Tyr Gly Gly Ser Gly Leu Asp Tyr
1 5 10 15

<210> 473
<211> 15
<212> PRT
<213> Artificial
<220>

<223> Artificial clone 73CDHR3 ligante de HER2 sintético

<400> 473

Tyr Gly Tyr Ser Tyr Ser Tyr Ser Ser Gly Ser Ala Leu Asp Tyr
1 5 10 15

<210> 474
<211> 15
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Artificial clone 74CDHR3 ligante de HER2 sintético

<400> 474

Ser Tyr Tyr Tyr Gly Gly Tyr Tyr Ser Gly Tyr Gly Met Asp Tyr
1 5 10 15

<210> 475
<211> 15
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Artificial clone 75CDHR3 ligante de HER2 sintético

<400> 475

Arg Arg Ser Tyr Tyr Ser Tyr Arg Tyr Ser Tyr Gly Leu Asp Tyr
1 5 10 15

<210> 476
<211> 15
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Artificial clone 76CDHR3 ligante de HER2 sintético

<400> 476

Arg Arg Ser Tyr Tyr Ser Tyr Ser Arg Ser Tyr Ala Met Asp Tyr
1 5 10 15

<210> 477
<211> 16
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Artificial clone 77CDHR3 ligante de HER2 sintético

<400> 477

Tyr Tyr Tyr Gly Tyr Tyr Ser Tyr Tyr Ser Gly Tyr Gly Leu Asp Tyr
1 5 10 15

<210> 478
<211> 16
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Artificial clone 78CDHR3 ligante de HER2 sintético

<400> 478

Tyr Tyr Tyr Gly Tyr Tyr Ser Tyr Tyr Gly Gly Ser Gly Leu Asp Tyr
1 5 10 15

<210> 479
<211> 16
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Artificial clone 79CDHR3 ligante de HER2 sintético

<400> 479

Tyr Tyr Tyr Gly Tyr Tyr Ser Tyr Tyr Gly Gly Ser Ala Met Asp Tyr
1 5 10 15

<210> 480
<211> 16
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Artificial clone 80CDHR3 ligante de HER2 sintético

<400> 480

Tyr Tyr Tyr Ser Gly Gly Ser Tyr Tyr Tyr Tyr Tyr Ala Phe Asp Tyr
1 5 10 15

<210> 481
<211> 16
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Artificial clone 81CDHR3 ligante de HER2 sintético

<400> 481

Tyr Tyr Tyr Ser Tyr Tyr Ser Tyr Tyr Ser Tyr Gly Gly Ile Asp Tyr
1 5 10 15

<210> 482

<211> 16
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Artificial clone 82CDHR3 ligante de HER2 sintético

<400> 482

Tyr Tyr Ser Ser Tyr Tyr Ser Tyr Tyr Tyr Tyr Gly Gly Met Asp Tyr
1 5 10 15

<210> 483
<211> 16
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Artificial clone 83CDHR3 ligante de HER2 sintético

<400> 483

Tyr Ser Tyr Tyr Tyr Tyr Ser Tyr Tyr Tyr Gly Ser Ala Met Asp Tyr
1 5 10 15

<210> 484
<211> 16
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Artificial clone 84CDHR3 ligante de HER2 sintético

<400> 484

Tyr Ser Tyr Tyr Tyr Tyr Ser Tyr Tyr Ser Gly Tyr Gly Phe Asp Tyr
1 5 10 15

<210> 485
<211> 16
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Artificial clone 85CDHR3 ligante de HER2 sintético

<400> 485

Tyr Ser Tyr Tyr Tyr Tyr Ser Tyr Tyr Ser Gly Tyr Gly Phe Asp Tyr
1 5 10 15

<210> 486
<211> 16
<212> PRT
<213> Artificial
<220>

<223> Artificial clone 86CDHR3 ligante de HER2 sintético

<400> 486

Tyr Ser Tyr Tyr Tyr Tyr Ser Tyr Tyr Gly Gly Ser Ala Phe Asp Tyr
1 5 10 15

<210> 487
<211> 16
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Artificial clone 87CDHR3 ligante de HER2 sintético

<400> 487

Tyr Ser Tyr Tyr Tyr Tyr Ser Tyr Tyr Gly Gly Ser Gly Met Asp Tyr
1 5 10 15

<210> 488
<211> 16
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Artificial clone 88CDHR3 ligante de HER2 sintético

<400> 488

Tyr Ser Tyr Tyr Tyr Tyr Ser Tyr Tyr Gly Gly Ser Gly Leu Asp Tyr
1 5 10 15

<210> 489
<211> 16
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Artificial clone 89CDHR3 ligante de HER2 sintético

<400> 489

Tyr Ser Tyr Ser Tyr Tyr Gly Tyr Tyr Tyr Gly Ser Gly Leu Asp Tyr
1 5 10 15

<210> 490
<211> 16
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Artificial clone 90CDHR3 ligante de HER2 sintético

<400> 490

Tyr Ser Ser Tyr Tyr Tyr Ser Tyr Tyr Ser Gly Ser Gly Leu Asp Tyr
1 5 10 15

<210> 491
<211> 16
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Artificial clone 91CDHR3 ligante de HER2 sintético

<400> 491

Ser Ser Tyr Tyr Tyr Tyr Ser Tyr Tyr Gly Gly Ser Gly Ile Asp Tyr
1 5 10 15

<210> 492
<211> 16
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Artificial clone 92CDHR3 ligante de HER2 sintético

<400> 492

Arg Ser Tyr Tyr Tyr Tyr Ser Tyr Tyr Tyr Ser Arg Ala Met Asp Tyr
1 5 10 15

<210> 493
<211> 17
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Artificial clone 93CDHR3 ligante de HER2 sintético

<400> 493

Ser Tyr Ser Ser Tyr Tyr Ser Tyr Tyr Ser Ser Tyr Gly Gly Met Asp
1 5 10 15

Tyr

<210> 494
<211> 21
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Artificial clone 94CDHR3 ligante de HER2 sintético

<400> 494

Tyr Arg Tyr Tyr Tyr Ser Arg Tyr Gly Tyr Arg Tyr Tyr Tyr Tyr Tyr
1 5 10 15

Arg Ala Leu Asp Tyr
20

<210> 495
<211> 8
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Artificial clone 95CDHR3 ligante de HER2 sintético

<400> 495

Arg Tyr Ser Ser Gly Met Asp Tyr
1 5

<210> 496
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Artificial clone 96CDHR3 ligante de HER2 sintético

<400> 496

Tyr Ser His Ser Gly Ala Phe Asp Tyr
1 5

<210> 497
<211> 10
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Artificial clone 97CDHR3 ligante de HER2 sintético

<400> 497

Gly Tyr Ser Tyr Gly His Gly Ile Asp Tyr
1 5 10

<210> 498
<211> 10
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Artificial clone 98CDHR3 ligante de HER2 sintético

<400> 498

Gly Ser Ser Phe Gly Arg Gly Phe Asp Tyr
1 5 10

<210> 499

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

<220>
<223> Artificial clone 99CDHR3 ligante de HER2 sintético

<400> 499

Gly Ser Ser Tyr Ser Trp Gly Leu Asp Tyr
1 5 10

<210> 500
<211> 10
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Artificial clone 100CDHR3 ligante de HER2 sintético

<400> 500

Gly Ser Arg Tyr Ser His Gly Met Asp Tyr
1 5 10

<210> 501
<211> 10
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Artificial clone 101CDHR3 ligante de HER2 sintético

<400> 501

Gly Ala Ser Tyr Gly Tyr Gly Met Asp Tyr
1 5 10

<210> 502
<211> 10
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Artificial clone 102CDHR3 ligante de HER2 sintético

<400> 502

Gly Met Ser Tyr Gly Tyr Gly Met Asp Tyr
1 5 10

<210> 503
<211> 10
<212> PRT
<213> Artificial
<220>

<223> Artificial clone 103CDHR3 ligante de HER2 sintético

<400> 503

Gly Gly Arg Tyr Asn His Gly Leu Asp Tyr
1 5 10

<210> 504
<211> 17
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Artificial clone 104CDHR3 ligante de HER2 sintético

<400> 504

Glu Tyr Tyr Gln Gly Tyr Gly Pro Tyr Arg Ser Thr Tyr Gly Leu Asp
1 5 10 15

Tyr

<210> 505
<211> 19
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Artificial clone 105CDHR3 ligante de HER2 sintético

<400> 505

Ser Ser Trp Ser Ser Arg Gly Val Ser Tyr Ser Arg Thr Ala Gly Gly
1 5 10 15

Met Asp Tyr

<210> 506
<211> 20
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Artificial clone 106CDHR3 ligante de HER2 sintético

<400> 506

Glu Gly Tyr Tyr Ser Val Ser Gly Ser Tyr Ser Tyr Ser Thr Arg Gly
1 5 10 15

Gly Pro Asp Tyr
20

<210> 507
<211> 9
<212> PRT

<213> Artificial

<220>
<223> Clone 1CDRL3 ligante de DR5 sintético

<400> 507

Gln Gln Tyr Ser Ser Tyr Pro Ser Thr
1 5

<210> 508
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Clone 2CDRL3 ligante de DR5 sintético

<400> 508

Gln Gln Tyr Ser Ser Tyr Pro Ser Thr
1 5

<210> 509
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Clone 3CDRL3 ligante de DR5 sintético

<400> 509

Gln Gln Tyr Tyr Tyr Tyr Pro Ser Thr
1 5

<210> 510
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Clone 4CDRL3 ligante de DR5 sintético

<400> 510

Gln Gln Tyr Ser Ser Tyr Pro Ser Thr
1 5

<210> 511
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Clone 5CDRL3 ligante de DR5 sintético

<400> 511

Gln Gln His Tyr Thr Thr Pro Pro Thr
1 5

<210> 512
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Clone 6CDRL3 ligante de DR5 sintético

<400> 512

Gln Gln Tyr Tyr Ser Ser Pro Ser Thr
1 5

<210> 513
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Clone 7CDRL3 ligante de DR5 sintético

<400> 513

Gln Gln Tyr Ser Tyr Ser Pro Ser Thr
1 5

<210> 514
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Clone 8CDRL3 ligante de DR5 sintético

<400> 514

Gln Gln Tyr Tyr Tyr Ser Pro Ser Thr
1 5

<210> 515
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Clone 9CDRL3 ligante de DR5 sintético

<400> 515

Gln Gln Tyr Ser Ser Ser Pro Ser Thr
1 5

<210> 516
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Clone 10CDRL3 ligante de DR5 sintético

<400> 516

Gln Gln His Tyr Thr Thr Pro Pro Thr
1 5

<210> 517
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Clone 11CDRL3 ligante de DR5 sintético

<400> 517

Gln Gln Tyr Tyr Ser Ser Pro Ser Thr
1 5

<210> 518
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Clone 12CDRL3 ligante de DR5 sintético

<400> 518

Gln Gln Tyr Tyr Ser Ser Pro Tyr Thr
1 5

<210> 519
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Clone 13CDRL3 ligante de DR5 sintético

<400> 519

Gln Gln Tyr Tyr Ser Ser Pro Ser Thr
1 5

<210> 520
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Clone 14CDRL3 ligante de DR5 sintético

<400> 520

Gln Gln Tyr Ser Ser Ser Pro Ser Thr
1 5

<210> 521
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Clone 15CDRL3 ligante de DR5 sintético

<400> 521

Gln Gln Ser Ser Tyr Ser Pro Ser Thr
1 5

<210> 522
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Clone 16CDRL3 ligante de DR5 sintético

<400> 522

Gln Gln Tyr Tyr Ser Ser Pro Ser Thr
1 5

<210> 523
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Clone 17CDRL3 ligante de DR5 sintético

<400> 523

Gln Gln Tyr Tyr Ser Ser Pro Ser Thr
1 5

<210> 524
<211> 10
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Clone 1CDRH1 ligante de DR5 sintético

<400> 524

Gly Phe Ser Ile Tyr Ser Tyr Ser Ile His
1 5 10

<210> 525
<211> 10
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Clone 2CDRH1 ligante de DR5 sintético

<400> 525

Gly Phe Ser Ile Tyr Ser Ser Ser Ile His
1 5 10

<210> 526
<211> 10
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Clone 3CDRH1 ligante de DR5 sintético

<400> 526

Gly Phe Tyr Ile Tyr Ser Tyr Ser Ile His
1 5 10

<210> 527
<211> 10
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Clone 4CDRH1 ligante de DR5 sintético

<400> 527

Gly Phe Ser Ile Tyr Ser Ser Ser Ile His
1 5 10

<210> 528
<211> 10
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Clone 5CDRH1 ligante de DR5 sintético

<400> 528

Gly Phe Ser Ile Tyr Ser Ser Ser Ile His
1 5 10

<210> 529

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

<220>
<223> Clone 6CDRH1 ligante de DR5 sintético

<400> 529

Gly Phe Tyr Ile Ser Tyr Ser Ser Ile His
1 5 10

<210> 530
<211> 10
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Clone 7CDRH1 ligante de DR5 sintético

<400> 530

Gly Phe Ser Ile Ser Ser Ser Ser Ile His
1 5 10

<210> 531
<211> 10
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Clone 8CDRH1 ligante de DR5 sintético

<400> 531

Gly Phe Tyr Ile Ser Ser Ser Ser Ile His
1 5 10

<210> 532
<211> 10
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Clone 9CDRH1 ligante de DR5 sintético

<400> 532

Gly Phe Ser Ile Ser Ser Ser Ser Ile His
1 5 10

<210> 533
<211> 10
<212> PRT
<213> Artificial
<220>

<223> Clone 10CDRH1 ligante de DR5 sintético

<400> 533

Gly Phe Tyr Ile Tyr Ser Ser Ser Ile His
1 5 10

<210> 534
<211> 10
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Clone 11CDRH1 ligante de DR5 sintético

<400> 534

Gly Phe Ser Ile Ser Ser Ser Ser Ile His
1 5 10

<210> 535
<211> 10
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Clone 12CDRH1 ligante de DR5 sintético

<400> 535

Gly Phe Ser Ile Ser Ser Ser Ser Ile His
1 5 10

<210> 536
<211> 10
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Clone 13CDRH1 ligante de DR5 sintético

<400> 536

Gly Phe Ser Ile Ser Ser Ser Ser Ile His
1 5 10

<210> 537
<211> 10
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Clone 14CDRH1 ligante de DR5 sintético

<400> 537

Gly Phe Tyr Ile Ser Ser Ser Tyr Ile His
1 5 10

<210> 538
<211> 10
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Clone 15CDRH1 ligante de DR5 sintético

<400> 538

Gly Phe Tyr Ile Tyr Ser Ser Ser Ile His
1 5 10

<210> 539
<211> 10
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Clone 16CDRH1 ligante de DR5 sintético

<400> 539

Gly Phe Tyr Ile Tyr Ser Ser Ser Ile His
1 5 10

<210> 540
<211> 10
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Clone 17CDRH1 ligante de DR5 sintético

<400> 540

Gly Phe Tyr Ile Ser Ser Ser Ser Ile His
1 5 10

<210> 541
<211> 17
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Clone 18CDRH1 ligante de DR5 sintético

<400> 541

Ser Ile Ser Pro Tyr Tyr Gly Tyr Thr Ser Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 542
<211> 17
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Clone 2CDRH2 ligante de DR5 sintético

<400> 542

Ser Ile Tyr Pro Tyr Ser Gly Ser Thr Ser Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 543
<211> 17
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Clone 3CDRH2 ligante de DR5 sintético

<400> 543

Ser Ile Ser Pro Tyr Tyr Gly Ser Thr Ser Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 544
<211> 17
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Clone 4CDRH2 ligante de DR5 sintético

<400> 544

Tyr Ile Ser Pro Ser Tyr Gly Tyr Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 545
<211> 17
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Clone 5CDRH2 ligante de DR5 sintético

<400> 545

Ser Ile Ser Pro Tyr Ser Gly Tyr Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 546
<211> 17
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Clone 6CDRH2 ligante de DR5 sintético

<400> 546

Tyr Ile Ser Pro Tyr Ser Gly Tyr Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 547
<211> 17
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Clone 7CDRH2 ligante de DR5 sintético

<400> 547

Ser Ile Ser Pro Ser Tyr Gly Tyr Thr Ser Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 548
<211> 17
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Clone 8CDRH2 ligante de DR5 sintético

<400> 548

Ser Ile Ser Pro Ser Ser Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 549
<211> 17
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Clone 9CDRH2 ligante de DR5 sintético

<400> 549

Ser Ile Ser Pro Tyr Tyr Gly Tyr Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 550
<211> 17
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Clone 10CDRH2 ligante de DR5 sintético

<400> 550

Ser Ile Ser Pro Ser Ser Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 551
<211> 17
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Clone 11CDRH2 ligante de DR5 sintético

<400> 551

Tyr Ile Ser Pro Tyr Ser Gly Tyr Thr Ser Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 552
<211> 17
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Clone 12CDRH2 ligante de DR5 sintético

<400> 552

Tyr Ile Tyr Pro Tyr Ser Gly Tyr Thr Ser Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 553
<211> 17
<212> PRT
<213> Artificial

<220>

<223> Clone 13CDRH2 ligante de DR5 sintético

<400> 553

Ser Ile Ser Pro Ser Ser Gly Tyr Thr Ser Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 554
<211> 17
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Clone 14CDRH2 ligante de DR5 sintético

<400> 554

Ser Ile Ser Pro Ser Tyr Gly Tyr Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 555
<211> 17
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Clone 15CDRH2 ligante de DR5 sintético

<400> 555

Ser Ile Ser Pro Ser Ser Gly Tyr Thr Ser Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 556
<211> 17
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Clone 16CDRH2 ligante de DR5 sintético

<400> 556

Tyr Ile Ser Pro Tyr Tyr Gly Ser Thr Ser Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 557
<211> 17

<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Clone 17CDRH2 ligante de DR5 sintético

<400> 557

Tyr Ile Ser Pro Ser Tyr Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 558
<211> 16
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Clone 1CDRH3 ligante de DR5 sintético

<400> 558

Arg Tyr Tyr Ser Tyr Arg Ser Tyr Ser Tyr Tyr Ser Gly Leu Asp Tyr
1 5 10 15

<210> 559
<211> 16
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Clone 2CDRH3 ligante de DR5 sintético

<400> 559

Arg Tyr Tyr Ser Ser Ser Tyr Arg Ser Ser Ser Tyr Gly Met Asp Tyr
1 5 10 15

<210> 560
<211> 16
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Clone 3CDRH3 ligante de DR5 sintético

<400> 560

Tyr Tyr Tyr Ser Tyr Tyr Tyr Tyr Gly Ser Tyr Tyr Gly Leu Asp Tyr
1 5 10 15

<210> 561
<211> 18
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Clone 4CDRH3 ligante de DR5 sintético

<400> 561

Arg Arg Tyr Ser Arg Tyr Tyr Arg Tyr Ser Ser Arg Tyr Arg Gly Phe
1 5 10 15

Asp Tyr

<210> 562
<211> 17
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Clone 5CDRH3 ligante de DR5 sintético

<400> 562

Tyr Arg Ser Tyr Arg Tyr Gly Tyr Tyr Arg Gly Gly Tyr Gly Phe Asp
1 5 10 15

Tyr

<210> 563
<211> 17
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Clone 6CDRH3 ligante de DR5 sintético

<400> 563

Tyr Arg Ser Tyr Arg Tyr Gly Tyr Tyr Arg Gly Ser Tyr Ala Leu Asp
1 5 10 15

Tyr

<210> 564
<211> 17
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Clone 7CDRH3 ligante de DR5 sintético

<400> 564

Tyr Arg Ser Tyr Arg Tyr Gly Ser Tyr Arg Gly Ser Tyr Gly Phe Asp
1 5 10 15

Tyr

<210> 565

<211> 17
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Clone 8CDRH3 ligante de DR5 sintético

<400> 565

Tyr Arg Ser Tyr Arg Tyr Gly Ser Tyr Tyr Gly Ser Tyr Gly Phe Asp
1 5 10 15

Tyr

<210> 566
<211> 17
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Clone 9CDRH3 ligante de DR5 sintético

<400> 566

Tyr Arg Arg Tyr Tyr Tyr Gly Tyr Tyr Tyr Gly Gly Tyr Gly Phe Asp
1 5 10 15

Tyr

<210> 567
<211> 17
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Clone 10CDRH3 ligante de DR5 sintético

<400> 567

Tyr Arg Arg Tyr Arg Tyr Gly Tyr Tyr Ser Gly Gly Tyr Gly Phe Asp
1 5 10 15

Tyr

<210> 568
<211> 17
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Clone 11CDRH3 ligante de DR5 sintético

<400> 568

Tyr Arg Arg Tyr Arg Tyr Gly Ser Tyr Tyr Ser Gly Tyr Ala Phe Asp
1 5 10 15

Tyr

<210> 569
<211> 17
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Clone 12CDRH3 ligante de DR5 sintético

<400> 569

Tyr Arg Arg Tyr Arg Tyr Gly Tyr Ser Tyr Gly Ser Tyr Gly Phe Asp
1 5 10 15

Tyr

<210> 570
<211> 17
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Clone 13CDRH3 ligante de DR5 sintético

<400> 570

Tyr Arg Gly Tyr Arg Tyr Gly Tyr Tyr Arg Gly Gly Tyr Ala Phe Asp
1 5 10 15

Tyr

<210> 571
<211> 17
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Clone 14CDRH3 ligante de DR5 sintético

<400> 571

Arg Arg Tyr Tyr Arg Tyr Gly Tyr Ser Arg Gly Ser Tyr Gly Leu Asp
1 5 10 15

Tyr

<210> 572
<211> 17
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Clone 15CDRH3 ligante de DR5 sintético

<400> 572

Arg Arg Ser Tyr Arg Tyr Gly Ser Tyr Arg Gly Ser Tyr Ala Phe Asp
1 5 10 15

Tyr

<210> 573
<211> 17
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Clone 16CDRH3 ligante de DR5 sintético

<400> 573

Arg Arg Pro Tyr Arg Tyr Gly Arg Ser Arg Gly Tyr Tyr Ala Phe Asp
1 5 10 15

Tyr

<210> 574
<211> 17
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Clone 17CDRH3 ligante de DR5 sintético

<400> 574

Met Arg Arg Tyr His Tyr Gly Arg Tyr Ser Gly Ala Tyr Gly Leu Asp
1 5 10 15

Tyr

<210> 575
<211> 17
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> CDRH3 sintético

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(1)
<223> X é R ou Y

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (10)..(10)
<223> X é Y ou R

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (14)..(14)

<223> X é R ou Y

<400> 575

Xaa Arg Ser Tyr Arg Tyr Gly Ser Tyr Xaa Gly Ser Tyr Xaa Phe Asp
1 5 10 15

Tyr

<210> 576
<211> 10
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> CDRH1 sintético

<400> 576

Gly Phe Tyr Ile Ser Ser Ser Ser Ile His
1 5 10

<210> 577
<211> 17
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> CDRH2 sintético

<400> 577

Ser Ile Ser Pro Ser Ser Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 578
<211> 17
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> CDRH3 sintético

<400> 578

Tyr Arg Ser Tyr Arg Tyr Gly Ser Tyr Tyr Gly Ser Tyr Gly Phe Asp
1 5 10 15

Tyr

<210> 579
<211> 10
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> CDRH1 sintético

<400> 579

Gly Phe Tyr Ile Tyr Ser Ser Ser Ile His
1 5 10

<210> 580
<211> 17
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> CDRH2 sintético

<400> 580

Ser Ile Ser Pro Ser Ser Gly Tyr Thr Ser Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 581
<211> 17
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> CDRH3 sintético

<400> 581

Arg Arg Ser Tyr Arg Tyr Gly Ser Tyr Arg Gly Ser Tyr Ala Phe Asp
1 5 10 15

Tyr

<210> 582
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> CDRH3 sintético

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(1)
<223> X é R ou Y

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (2)..(2)
<223> X é R, S, ou Y
<220>

<221> MISC_FEATURE
<222> (3)..(3)
<223> X é S, G, Y, ou H

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (4)..(4)
<223> X é S, G, Y, ou R

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (5)..(5)
<223> X é G ou A

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (6)..(6)
<223> X é F, M, L, ou A

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (7)..(7)
<223> X é F, M, L, ou nenhum aminoácido

<400> 582

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Asp Tyr
1 5

<210> 583
<211> 10
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> CDRH3 sintético

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(1)
<223> X é G, S, ou Y

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (2)..(2)
<223> X é Y, S, G, R, A, ou M

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (3)..(3)
<223> X é G, R, S, ou Y

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (4)..(4)
<223> X é F, G, ou Y

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (5)..(5)
<223> X é G, N, S, ou Y

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (6)..(6)
<223> X é H, R, W, ou Y

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (7)..(7)
<223> X é A ou G

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (8)..(8)
<223> X é F, I, L, ou M

<400> 583

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Asp Tyr
1 5 10

<210> 584
<211> 21
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> CDRH3 sintético

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(1)
<223> X é Y, S, R, G, ou E

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (2)..(2)
<223> X é Y, S, R, ou G

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (3)..(3)
<223> X é S, Y, G, ou W

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (4)..(4)
<223> X é S, Y, G, ou W

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (5)..(5)

<223> X é G, Y, ou S

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (6)..(6)
<223> X é G, Y, S, R, ou V

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (7)..(7)
<223> X é S, Y, G, ou R

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (8)..(8)
<223> X é Y, S, G, R, P, ou V

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (9)..(9)
<223> X é G, A, R, S, ou Y

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (10)..(10)
<223> X é M, F, G, Y, S, ou R

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (11)..(11)
<223> X é A, G, R, S, Y, ou nenhum aminoácido

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (12)..(12)
<223> X é A, F, G, I, L, M, R, S, T, Y, ou nenhum aminoácido

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (13)..(13)
<223> X é A, F, G, L, M, S, T, Y, ou nenhum aminoácido

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (14)..(14)
<223> X é L, M, F, I, G, Y, A, T, ou nenhum aminoácido

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (15)..(15)
<223> X é M, L, Y, G, R, ou nenhum aminoácido

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (16)..(16)
<223> X é G, Y, ou nenhum aminoácido

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (17)..(17)
<223> X é G, R, M, ou nenhum aminoácido

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (18)..(18)
<223> X é A, P, ou nenhum aminoácido

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (19)..(19)
<223> X é L ou nenhum aminoácido

<400> 584

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
1 5 10 15

Xaa Xaa Xaa Asp Tyr
20

<210> 585
<211> 6
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Sequência upstream de iniciação de transcrição sintética

<220>
<221> misc_feature
<222> (2)..(2)
<223> N não pode ser qualquer nucleotídeo

<400> 585
cncaat 6

<210> 586
<211> 6
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Sinal sintético

<400> 586
aataaa 6

<210> 587
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial

<220>

<223> CDRL3 sintético

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (6)..(6)
<223> X é Y ou S

<400> 587

Gln Gln Ser Tyr Tyr Xaa Pro Ser Thr
1 5

<210> 588
<211> 10
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> CDRH1 sintético

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (5)..(5)
<223> X é independentemente Y ou S

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (6)..(6)
<223> X é independentemente Y ou S

<400> 588

Gly Phe Ser Ile Xaa Xaa Ser Tyr Ile His
1 5 10

<210> 589
<211> 17
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> synthetic CDRH2

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (5)..(5)
<223> X é independentemente Y ou S

<400> 589

Ser Ile Tyr Pro Xaa Ser Gly Tyr Thr Ser Tyr Ala Asp Ser Lys Val
1 5 10 15

Gly

<210> 590

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

<220>
<223> CDRH1 sintético

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (3)..(3)
<223> X is either Y or S

<400> 590

Gly Phe Xaa Ile Ser Tyr Ser Ser Ile His
1 5 10

<210> 591
<211> 17
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> CDRH2 sintético

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (5)..(5)
<223> X é independentemente Y ou S

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (8)..(8)
<223> X é independentemente Y ou S

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (10)..(10)
<223> X é independentemente Y ou S

<400> 591

Ser Ile Tyr Pro Xaa Tyr Gly Xaa Thr Xaa Tyr Ala Asp Ser Lys Val
1 5 10 15

Gly

<210> 592
<211> 16
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> CDRH3 sintético

<220>

<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(1)
<223> X é Y, S, ou R

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (2)..(2)
<223> X é Y ou S

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (3)..(3)
<223> X é G, Y, ou S

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (4)..(4)
<223> X é Y, S, R, ou G

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (10)..(10)
<223> X é Y, S, ou G

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (12)..(12)
<223> X é Y, S, G, ou R

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (13)..(13)
<223> X é G ou A

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (14)..(14)
<223> X é M, I, F, ou L

<400> 592

Xaa Xaa Xaa Xaa Tyr Tyr Ser Tyr Tyr Xaa Gly Xaa Xaa Xaa Asp Tyr
1 5 10 15

<210> 593
<211> 10
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> CDRH2 sintético

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (3)..(3)
<223> X é Y ou S

<400> 593

Gly Phe Xaa Ile Ser Ser Ser Ser Ile His
1 5 10

<210> 594
<211> 17
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> CDRH2 sintético

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(1)
<223> X é independentemente Y ou S

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (3)..(3)
<223> X é independentemente Y ou S

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (10)..(10)
<223> X é independentemente Y ou S

<400> 594

Xaa Ile Xaa Pro Ser Ser Gly Tyr Thr Xaa Tyr Ala Asp Ser Lys Val
1 5 10 15

Gly

<210> 595
<211> 184
<212> PRT
<213> *homo sapiens*

<400> 595

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

Tyr Lys Asp Asp Asp Asp Lys Leu Ser Ala Leu Ile Thr Gln Gln Asp
20 25 30

Leu Ala Pro Gln Gln Arg Val Ala Pro Gln Gln Lys Arg Ser Ser Pro
35 40 45

Ser Glu Gly Leu Cys Pro Pro Gly His His Ile Ser Glu Asp Gly Arg
50 55 60

Asp Cys Ile Ser Cys Lys Tyr Gly Gln Asp Tyr Ser Thr His Trp Asn
65 70 75 80

Asp Leu Leu Phe Cys Leu Arg Cys Thr Arg Cys Asp Ser Gly Glu Val
85 90 95

Glu Leu Ser Pro Cys Thr Thr Thr Arg Asn Thr Val Cys Gln Cys Glu
100 105 110

Glu Gly Thr Phe Arg Glu Glu Asp Ser Pro Glu Met Cys Arg Lys Cys
115 120 125

Arg Thr Gly Cys Pro Arg Gly Met Val Lys Val Gly Asp Cys Thr Pro
130 135 140

Trp Ser Asp Ile Glu Cys Val His Lys Glu Ser Gly Thr Lys His Ser
145 150 155 160

Gly Glu Ala Pro Ala Val Glu Glu Thr Val Thr Ser Ser Pro Gly Thr
165 170 175

Pro Ala Ser Pro Cys Ser Leu Ser
180

<210> 596
<211> 17
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> CDRH3 sintético

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (3)..(3)
<223> X é Y, S, R, P, ou G

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (8)..(8)
<223> X é R, Y, ou S

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (9)..(9)
<223> X é G, Y, ou S

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (10)..(10)
<223> X é S, Y, ou R

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (14)..(14)
<223> X é G ou A

<220>
<221> MISC_FEATURE

<222> (15)..(15)
<223> X é L ou F

<400> 596

Tyr Arg Xaa Tyr Arg Tyr Gly Xaa Xaa Xaa Gly Ser Tyr Xaa Xaa Asp
1 5 10 15

Tyr

<210> 597
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> CDRL3 sintético

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (3)..(3)
<223> X é independentemente Y ou S

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (4)..(4)
<223> X é independentemente Y ou S

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (5)..(5)
<223> X é independentemente Y ou S

<400> 597

Gln Gln Xaa Xaa Xaa Ser Pro Ser Thr
1 5

<210> 598
<211> 10
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> CDRH1 sintético

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (3)..(3)
<223> X é independentemente Y ou S

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (5)..(5)
<223> X é independentemente Y ou S
<400> 598

Gly Phe Xaa Ile Xaa Ser Ser Ser Ile His
1 5 10

<210> 599
<211> 17
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> CDRH2 sintético

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(1)
<223> X é independentemente Y ou S

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (5)..(5)
<223> X é independentemente Y ou S

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (6)..(6)
<223> X é independentemente Y ou S

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (10)..(10)
<223> X é independentemente Y ou S

<400> 599

Xaa Ile Ser Pro Xaa Xaa Gly Tyr Thr Xaa Tyr Ala Asp Ser Lys Val
1 5 10 15

Gly

<210> 600
<211> 7
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> BDF1 CDRH1 sintético

<400> 600

Ile Gly Lys Ser Gly Ile His
1 5

<210> 601
<211> 14
<212> PRT
<213> Artificial
<220>

<223> BDF1 CDRH2 sintético

<400> 601

Val Ala Val Ile Tyr Pro His Asp Gly Asn Thr Ala Tyr Ala
1 5 10

<210> 602
<211> 10
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> BDF1 CDRH3 sintético

<400> 602

Arg Leu Ala Leu Val Arg Met Trp Met Asp
1 5 10

<210> 603
<211> 16
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> CDRH3 sintético

<400> 603

Tyr Ser Ser Tyr Tyr Ser Tyr Tyr Tyr Ser Ser Ser Ser Tyr Ser Tyr
1 5 10 15

<210> 604
<211> 411
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 604

Met Glu Gln Arg Gly Gln Asn Ala Pro Ala Ala Ser Gly Ala Arg Lys
1 5 10 15

Arg His Gly Pro Gly Pro Arg Glu Ala Arg Gly Ala Arg Pro Gly Leu
20 25 30

Arg Val Pro Lys Thr Leu Val Leu Val Val Ala Ala Val Leu Leu Leu
35 40 45

Val Ser Ala Glu Ser Ala Leu Ile Thr Gln Gln Asp Leu Ala Pro Gln
50 55 60

Gln Arg Ala Ala Pro Gln Gln Lys Arg Ser Ser Pro Ser Glu Gly Leu
65 70 75 80

Cys Pro Pro Gly His His Ile Ser Glu Asp Gly Arg Asp Cys Ile Ser
85 90 95

```
Cys Lys Tyr Gly Gln Asp Tyr Ser Thr His Trp Asn Asp Leu Leu Phe
            100                 105                 110

Cys Leu Arg Cys Thr Arg Cys Asp Ser Gly Glu Val Glu Leu Ser Pro
        115                 120                 125


Cys Thr Thr Thr Arg Asn Thr Val Cys Gln Cys Glu Glu Gly Thr Phe
    130                 135                 140

Arg Glu Glu Asp Ser Pro Glu Met Cys Arg Lys Cys Arg Thr Gly Cys
145                 150                 155                 160

Pro Arg Gly Met Val Lys Val Gly Asp Cys Thr Pro Trp Ser Asp Ile
                165                 170                 175

Glu Cys Val His Lys Glu Ser Gly Ile Ile Ile Gly Val Thr Val Ala
            180                 185                 190

Ala Val Val Leu Ile Val Ala Val Phe Val Cys Lys Ser Leu Leu Trp
        195                 200                 205

Lys Lys Val Leu Pro Tyr Leu Lys Gly Ile Cys Ser Gly Gly Gly Gly
    210                 215                 220

Asp Pro Glu Arg Val Asp Arg Ser Ser Gln Arg Pro Gly Ala Glu Asp
225                 230                 235                 240

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

```
Glu Gln Glu Met Glu Val Gln Glu Pro Ala Glu Pro Thr Gly Val Asn
            260                 265                 270

Met Leu Ser Pro Gly Glu Ser Glu His Leu Leu Glu Pro Ala Glu Ala
        275                 280                 285

Glu Arg Ser Gln Arg Arg Arg Leu Leu Val Pro Ala Asn Glu Gly Asp
    290                 295                 300

Pro Thr Glu Thr Leu Arg Gln Cys Phe Asp Asp Phe Ala Asp Leu Val
305                 310                 315                 320

Pro Phe Asp Ser Trp Glu Pro Leu Met Arg Lys Leu Gly Leu Met Asp
                325                 330                 335

Asn Glu Ile Lys Val Ala Lys Ala Glu Ala Ala Gly His Arg Asp Thr
            340                 345                 350

Leu Tyr Thr Met Leu Ile Lys Trp Val Asn Lys Thr Gly Arg Asp Ala
        355                 360                 365

Ser Val His Thr Leu Leu Asp Ala Leu Glu Thr Leu Gly Glu Arg Leu
    370                 375                 380

Ala Lys Gln Lys Ile Glu Asp His Leu Leu Ser Ser Gly Lys Phe Met
385                 390                 395                 400
```

Tyr Leu Glu Gly Asn Ala Asp Ser Ala Leu Ser
405 410

<210> 605
<211> 120
<212> PRT
<213> *Mus musculus*

<400> 605

Gly Leu Gln Arg Pro Glu Glu Ser Pro Ser Arg Gly Pro Cys Leu Ala
1 5 10 15

Gly Gln Tyr Leu Ser Glu Gly Asn Cys Lys Pro Cys Arg Glu Gly Ile
20 25 30

Asp Tyr Thr Ser His Ser Asn His Ser Leu Asp Ser Cys Ile Leu Cys
35 40 45

Thr Val Cys Lys Glu Asp Lys Val Val Glu Thr Arg Cys Asn Ile Thr
50 55 60

Thr Asn Thr Val Cys Arg Cys Lys Pro Gly Thr Phe Glu Asp Lys Asp
65 70 75 80

Ser Pro Glu Ile Cys Gln Ser Cys Ser Asn Cys Thr Asp Gly Glu Glu
85 90 95

Glu Leu Thr Ser Cys Thr Pro Arg Glu Asn Arg Lys Cys Val Ser Lys
100 105 110

Thr Ala Trp Ala Ser Trp His Lys
115 120

<210> 606
<211> 281
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 606

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

Val Leu Ile Val Ile Phe Thr Val Leu Leu Gln Ser Leu Cys Val Ala
20 25 30

Val Thr Tyr Val Tyr Phe Thr Asn Glu Leu Lys Gln Met Gln Asp Lys
35 40 45

Tyr Ser Lys Ser Gly Ile Ala Cys Phe Leu Lys Glu Asp Asp Ser Tyr
50 55 60

Trp Asp Pro Asn Asp Glu Glu Ser Met Asn Ser Pro Cys Trp Gln Val
65 70 75 80

Lys Trp Gln Leu Arg Gln Leu Val Arg Lys Met Ile Leu Arg Thr Ser
85 90 95

Glu Glu Thr Ile Ser Thr Val Gln Glu Lys Gln Gln Asn Ile Ser Pro
100 105 110

Leu Val Arg Glu Arg Gly Pro Gln Arg Val Ala Ala His Ile Thr Gly
115 120 125

Thr Arg Gly Arg Ser Asn Thr Leu Ser Ser Pro Asn Ser Lys Asn Glu
130 135 140

Lys Ala Leu Gly Arg Lys Ile Asn Ser Trp Glu Ser Ser Arg Ser Gly
145 150 155 160

His Ser Phe Leu Ser Asn Leu His Leu Arg Asn Gly Glu Leu Val Ile
165 170 175

His Glu Lys Gly Phe Tyr Tyr Ile Tyr Ser Gln Thr Tyr Phe Arg Phe
180 185 190

Gln Glu Glu Ile Lys Glu Asn Thr Lys Asn Asp Lys Gln Met Val Gln
195 200 205

Tyr Ile Tyr Lys Tyr Thr Ser Tyr Pro Asp Pro Ile Leu Leu Met Lys
210 215 220

Ser Ala Arg Asn Ser Cys Trp Ser Lys Asp Ala Glu Tyr Gly Leu Tyr
225 230 235 240

Ser Ile Tyr Gln Gly Gly Ile Phe Glu Leu Lys Glu Asn Asp Arg Ile
245 250 255

Phe Val Ser Val Thr Asn Glu His Leu Ile Asp Met Asp His Glu Ala
260 265 270

Ser Phe Phe Gly Ala Phe Leu Val Gly
275 280

<210> 607
<211> 168
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Apo-2L sintético

<400> 607

Val Arg Glu Arg Gly Pro Gln Arg Val Ala Ala His Ile Thr Gly Thr
1 5 10 15

Arg Gly Arg Ser Asn Thr Leu Ser Ser Pro Asn Ser Lys Asn Glu Lys
20 25 30

Ala Leu Gly Arg Lys Ile Asn Ser Trp Glu Ser Ser Arg Ser Gly His
35 40 45

Ser Phe Leu Ser Asn Leu His Leu Arg Asn Gly Glu Leu Val Ile His
50 55 60

Glu Lys Gly Phe Tyr Tyr Ile Tyr Ser Gln Thr Tyr Phe Arg Phe Gln
65 70 75 80

Glu Glu Ile Lys Glu Asn Thr Lys Asn Asp Lys Gln Met Val Gln Tyr
85 90 95

Ile Tyr Lys Tyr Thr Ser Tyr Pro Asp Pro Ile Leu Leu Met Lys Ser
100 105 110

Ala Arg Asn Ser Cys Trp Ser Lys Asp Ala Glu Tyr Gly Leu Tyr Ser
115 120 125

Ile Tyr Gln Gly Gly Ile Phe Glu Leu Lys Glu Asn Asp Arg Ile Phe
130 135 140

Val Ser Val Thr Asn Glu His Leu Ile Asp Met Asp His Glu Ala Ser
145 150 155 160

Phe Phe Gly Ala Phe Leu Val Gly
165

<210> 608
<211> 6
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> CDRH3 sintético

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(3)
<223> X são quaisquer aminoácido, exceto cistéina

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (4)..(4)
<223> X é qualquer aminoácido e pode variar em comprimento

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (5)..(6)
<223> X são quaisquer aminoácido, exceto cistéina

<400> 608

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
1 5

<210> 609
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> CDRL3 sintético

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(5)
<223> X é S ou qualquer um de Y, W, R, ou F

<220>
<221> misc_feature
<222> (6)..(6)
<223> Xaa pode ser qualquer aminoácido que ocorre naturalmente

<220>
<221> misc_feature
<222> (8)..(8)
<223> Xaa pode ser qualquer aminoácido que ocorre naturalmente

<400> 609

Gln Gln Xaa Xaa Xaa Xaa Pro Xaa Thr
1 5

<210> 610
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> CDRL3 sintético

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(5)
<223> X são quaisquer aminoácido, exceto cistéina

<220>
<221> misc_feature
<222> (6)..(6)
<223> Xaa pode ser qualquer aminoácido que ocorre naturalmente

<220>
<221> misc_feature
<222> (8)..(8)
<223> Xaa pode ser qualquer aminoácido que ocorre naturalmente

<400> 610

Gln Gln Xaa Xaa Xaa Xaa Pro Xaa Thr
1 5

<210> 611
<211> 19
<212> PRT
<213> Artificial
<220>

<223> CDRH3 sintético

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(17)
<223> X é S ou qualquer um de A, C, F, G, I, L, W, P, R, T, W, ou Y, ou não esta presente

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (18)..(18)
<223> X é G ou A, ou não esta presente

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (19)..(19)
<223> X é F, L, I, ou M, ou não esta presente

<400> 611

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
1 5 10 15

Xaa Xaa Xaa

<210> 612
<211> 10
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> CDRH1 sintético

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (3)..(3)
<223> X é S ou qualquer um do Y, W, R, ou F

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (5)..(8)
<223> X é S ou qualquer um do Y, W, R, ou F

<400> 612

Gly Phe Xaa Ile Xaa Xaa Xaa Xaa Ile His
1 5 10

<210> 613
<211> 17
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> CDRH2 sintético

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(1)
<223> X é S ou qualquer um de Y, W, R, ou F

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (3)..(3)
<223> X é S ou qualquer um de Y, W, R, ou F

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (5)..(6)
<223> X é S ou qualquer um de Y, W, R, ou F

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (8)..(8)
<223> X is S and one of Y, W, R, or F

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (10)..(10)
<223> X é S ou qualquer um de of Y, W, R, ou F

<400> 613

Xaa Ile Xaa Pro Xaa Xaa Gly Xaa Thr Xaa Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 614
<211> 10
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> CDRH1 sintético

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(5)
<223> X é qualquer aminoácido, exceto cistéina

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (6)..(8)
<223> Xaa pode ser qualquer aminoácido que ocorre naturalmente

<400> 614

Gly Phe Xaa Ile Xaa Xaa Xaa Xaa Ile His
1 5 10

<210> 615

<211> 17
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> CDRH2 sintético

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(1)
<223> X é qualquer aminoácido, exceto cistéina

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (3)..(3)
<223> X é qualquer aminoácido, exceto cistéina

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (5)..(6)
<223> X é qualquer aminoácido, exceto cistéina

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (8)..(8)
<223> X é qualquer aminoácido, exceto cistéina

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (10)..(10)
<223> X é qualquer aminoácido, exceto cistéina

<400> 615

Xaa Ile Xaa Pro Xaa Xaa Gly Xaa Thr Xaa Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 616
<211> 10
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> CDRH3 sintético

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(5)
<223> X é qualquer aminoácido, exceto cistéina

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (6)..(6)
<223> X é qualquer aminoácido, exceto cistéina, e pode variar em

comprimento

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (7)..(8)
<223> X é qualquer aminoácido, exceto cistéina

<400> 616

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Asp Tyr
1 5 10

<210> 617
<211> 21
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> CDRH3 sintético

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(1)
<223> X é Y, S, G, R, ou E

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (2)..(2)
<223> X é Y, S, G, R, M, ou A

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (3)..(3)
<223> X é Y, S, G, R, W, ou H

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (4)..(4)
<223> X é Y, S, G, R, F, ou Q

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (5)..(5)
<223> X é G, Y, N, A, ou S

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (6)..(6)
<223> X é F, M, L, A, R, G, H, W, V, Y, ou S

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (7)..(7)
<223> X é M, L, G, A, R, F, Y, or S, ou não esta presente

<220>

<221> MISC_FEATURE
<222> (8)..(8)
<223> X é M, L, F, I, R, G, P, V, Y, ou S, ou não esta presente

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (9)..(9)
<223> X é G, Y, R, ou S, ou não esta presente

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (10)..(10)
<223> X é M, F, G, Y, R, ou S, ou não esta presente

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (11)..(11)
<223> X é A, G, Y, R, ou S, ou não esta presente

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (12)..(12)
<223> X é I, M, F, A, G, R, T, Y, ou S, ou não esta presente

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (13)..(13)
<223> X é F, M, L, G, A, T, Y, ou S, ou não esta presente

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (14)..(14)
<223> X é L, F, M, I, G, A, T, ou Y, ou não esta presente

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (15)..(15)
<223> X é M, Y, G, L, ou R, ou não esta presente

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (16)..(16)
<223> X é Y ou G, ou não esta presente

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (17)..(17)
<223> X é R, M, ou G, ou não esta presente

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (18)..(18)
<223> X é G ou A

<220>
<221> MISC_FEATURE

<222> (19)..(19)
<223> X é F, M, L, ou I

<400> 617

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
1 5 10 15

Xaa Xaa Xaa Asp Tyr
20

<210> 618
<211> 48
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> oligonucleotídeos sintéticos

<400> 618
gcagcttctg gcttctmtat ttmttmttmt tmtatacact gggtgcgt 48

<210> 619
<211> 60
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> oligonucleotídeos sintéticos

<400> 619
ctggaatggg ttgcatmtat ttmtccatmt tmtggttmta cttmttatgc cgatagcgtc 60

<210> 620
<211> 54
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> oligonucleotídeos sintéticos

<400> 620
acttattact gtcagcaatm ttmttmttmt ccatmtacgt tcggacaggg tacc 54

<210> 621
<211> 54
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> oligonucleotídeos sintéticos

<400> 621
gtctattatt gtgctcgckc tkctkctkct gstwtkgact actggggtca agga 54

<210> 622

<211> 57
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> oligonucleotídeos sintéticos

<400> 622
gtctattatt gtgctcgckc tkctkctkct kctgstwtkg actactgggg tcaagga 57

<210> 623
<211> 60
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> oligonucleotídeos sintéticos

<400> 623
gtctattatt gtgctcgckc tkctkctkct kctkctgstw tkgactactg gggtcaagga 60

<210> 624
<211> 63
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> oligonucleotídeos sintéticos

<400> 624
gtctattatt gtgctcgckc tkctkctkct kctkctkctg stwtkgacta ctggggtcaa 60

gga 63

<210> 625
<211> 66
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> oligonucleotídeos sintéticos

<400> 625
gtctattatt gtgctcgckc tkctkctkct kctkctkctk ctgstwtkga ctactggggt 60

caagga 66

<210> 626
<211> 69
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> oligonucleotídeos sintéticos

<400> 626

gtctattatt gtgctcgckc tkctkctkct kctkctkctk ctkctgstwt kgactactgg 60

ggtcaagga 69

<210> 627
<211> 72
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> oligonucleotídeos sintéticos

<400> 627
gtctattatt gtgctcgckc tkctkctkct kctkctkctk ctkctkctgs twtkgactac 60

tggggtcaag ga 72

<210> 628
<211> 75
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> oligonucleotídeos sintéticos

<400> 628
gtctattatt gtgctcgckc tkctkctkct kctkctkctk ctkctkctkc tgstwtkgac 60

tactggggtc aagga 75

<210> 629
<211> 78
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> oligonucleotídeos sintéticos

<400> 629
gtctattatt gtgctcgckc tkctkctkct kctkctkctk ctkctkctkc tkctgstwtk 60

gactactggg gtcaagga 78

<210> 630
<211> 81
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> oligonucleotídeos sintéticos

<400> 630
gtctattatt gtgctcgckc tkctkctkct kctkctkctk ctkctkctkc tkctkctgst 60

wtkgactact ggggtcaagg a 81

<210> 631
<211> 84
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> oligonucleotídeos sintéticos

<400> 631
gtctattatt gtgctcgckc tkctkctkct kctkctkctk ctkctkctkc tkctkctkct 60

gstwtkgact actggggtca agga 84

<210> 632
<211> 87
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> oligonucleotídeos sintéticos

<400> 632
gtctattatt gtgctcgckc tkctkctkct kctkctkctk ctkctkctkc tkctkctkct 60

kctgstwtkg actactgggg tcaagga 87

<210> 633
<211> 90
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> oligonucleotídeos sintéticos

<400> 633
gtctattatt gtgctcgckc tkctkctkct kctkctkctk ctkctkctkc tkctkctkct 60

kctkctgstw tkgactactg gggtcaagga 90

<210> 634
<211> 93
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> oligonucleotídeos sintéticos

<400> 634
gtctattatt gtgctcgckc tkctkctkct kctkctkctk ctkctkctkc tkctkctkct 60

kctkctkctg stwtkgacta ctggggtcaa gga 93

<210> 635
<211> 54
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> oligonucleotídeos sintéticos

<400> 635
gtctattatt gtgctcgcts ctsctsctsc gstwtkgact actggggtca agga 54

<210> 636
<211> 57
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> oligonucleotídeos sintéticos

<400> 636
gtctattatt gtgctcgcts ctsctsctsc tscgstwtkg actactgggg tcaagga 57

<210> 637
<211> 60
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> oligonucleotídeos sintéticos

<400> 637
gtctattatt gtgctcgcts ctsctsctsc tsctscgstw tkgactactg gggtcaagga 60

<210> 638
<211> 63
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> oligonucleotídeos sintéticos

<400> 638
gtctattatt gtgctcgcts ctsctsctsc tsctsctscg stwtkgacta ctggggtcaa 60

gga 63

<210> 639
<211> 66
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> oligonucleotídeos sintéticos

<400> 639
gtctattatt gtgctcgcts ctsctsctsc tsctsctsct scgstwtkga ctactggggt 60

caagga 66

<210> 640
<211> 69

<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> oligonucleotídeos sintéticos

<400> 640
gtctattatt gtgctcgcts ctsctsctsc tsctsctsct sctscgstwt kgactactgg 60

ggtcaagga 69

<210> 641
<211> 72
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> oligonucleotídeos sintéticos

<400> 641
gtctattatt gtgctcgcts ctsctsctsc tsctsctsct sctsctscgs twtkgactac 60

tggggtcaag ga 72

<210> 642
<211> 75
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> oligonucleotídeos sintéticos

<400> 642
gtctattatt gtgctcgcts ctsctsctsc tsctsctsct sctsctscts cgstwtkgac 60

tactggggtc aagga 75

<210> 643
<211> 78
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> oligonucleotídeos sintéticos

<400> 643
gtctattatt gtgctcgcts ctsctsctsc tsctsctsct sctsctscts ctscgstwtk 60

gactactggg gtcaagga 78

<210> 644
<211> 81
<212> DNA
<213> Artificial

<220>

<223> oligonucleotídeos sintéticos

<400> 644
gtctattatt gtgctcgcts ctsctsctsc tsctsctsct sctsctscts ctsctscgst 60

wtkgactact ggggtcaagg a 81

<210> 645
<211> 84
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> oligonucleotídeos sintéticos

<400> 645
gtctattatt gtgctcgcts ctsctsctsc tsctsctsct sctsctscts ctsctsctsc 60

gstwtkgact actggggtca agga 84

<210> 646
<211> 87
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> oligonucleotídeos sintéticos

<400> 646
gtctattatt gtgctcgcts ctsctsctsc tsctsctsct sctsctscts ctsctsctsc 60

tscgstwtkg actactgggg tcaagga
87

<210> 647
<211> 90
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> oligonucleotídeos sintéticos

<400> 647
gtctattatt gtgctcgcts ctsctsctsc tsctsctsct sctsctscts ctsctsctsc 60

tsctscgstw tkgactactg gggtcaagga 90

<210> 648
<211> 93
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> oligonucleotídeos sintéticos

<400> 648

gtctattatt gtgctcgcts ctsctsctsc tsctsctsct sctsctscts ctsctsctsc 60

tsctsctscg stwtkgacta ctggggtcaa gga 93

<210> 649
<211> 54
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> oligonucleotídeos sintéticos

<400> 649
gtctattatt gtgctcgcty ctyctyctyc gstwtkgact actggggtca agga 54

<210> 650
<211> 57
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> oligonucleotídeos sintéticos

<400> 650
gtctattatt gtgctcgcty ctyctyctyc tycgstwtkg actactgggg tcaagga 57

<210> 651
<211> 60
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> oligonucleotídeos sintéticos

<400> 651
gtctattatt gtgctcgcty ctyctyctyc tyctycgstw tkgactactg gggtcaagga 60

<210> 652
<211> 63
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> oligonucleotídeos sintéticos

<400> 652
gtctattatt gtgctcgcty ctyctyctyc tyctyctycg stwtkgacta ctggggtcaa 60

gga 63

<210> 653
<211> 66
<212> DNA
<213> Artificial

<220>

<223> oligonucleotídeos sintéticos

<400> 653
gtctattatt gtgctcgcty ctyctyctyc tyctyctyct ycgstwtkga ctactggggt 60

caagga 66

<210> 654
<211> 69
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> oligonucleotídeos sintéticos

<400> 654
gtctattatt gtgctcgcty ctyctyctyc tyctyctyct yctycgstwt kgactactgg 60

ggtcaagga 69

<210> 655
<211> 72
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> oligonucleotídeos sintéticos

<400> 655
gtctattatt gtgctcgcty ctyctyctyc tyctyctyct yctyctycgs twtkgactac 60

tggggtcaag ga 72

<210> 656
<211> 75
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> oligonucleotídeos sintéticos

<400> 656
gtctattatt gtgctcgcty ctyctyctyc tyctyctyct yctyctycty cgstwtkgac 60

tactggggtc aagga 75

<210> 657
<211> 78
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> oligonucleotídeos sintéticos

<400> 657
gtctattatt gtgctcgcty ctyctyctyc tyctyctyct yctyctycty ctycgstwtk 60

gactactggg gtcaagga 78

<210> 658
<211> 81
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> oligonucleotídeos sintéticos

<400> 658
gtctattatt gtgctcgcty ctyctyctyc tyctyctyct yctyctycty ctyctycgst 60

wtkgactact ggggtcaagg a 81

<210> 659
<211> 84
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> oligonucleotídeos sintéticos

<400> 659
gtctattatt gtgctcgcty ctyctyctyc tyctyctyct yctyctycty ctyctyctyc 60

gstwtkgact actggggtca agga 84

<210> 660
<211> 87
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> oligonucleotídeos sintéticos

<400> 660
gtctattatt gtgctcgcty ctyctyctyc tyctyctyct yctyctycty ctyctyctyc 60

tycgstwtkg actactgggg tcaagga 87

<210> 661
<211> 90
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> oligonucleotídeos sintéticos

<400> 661
gtctattatt gtgctcgcty ctyctyctyc tyctyctyct yctyctycty ctyctyctyc 60

tyctycgstw tkgactactg gggtcaagga 90

<210> 662
<211> 93

<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> oligonucleotídeos sintéticos

<400> 662
gtctattatt gtgctcgcty ctyctyctyc tyctyctyct yctyctycty ctyctyctyc 60

tyctyctycg stwtkgacta ctggggtcaa gga 93

<210> 663
<211> 54
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> oligonucleotídeos sintéticos

<400> 663
gtctattatt gtgctcgcrg crgcrgcrgc gstwtkgact actggggtca agga 54

<210> 664
<211> 57
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> oligonucleotídeos sintéticos

<400> 664
gtctattatt gtgctcgcrg crgcrgcrgc rgcgstwtkg actactgggg tcaagga 57

<210> 665
<211> 60
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> oligonucleotídeos sintéticos

<400> 665
gtctattatt gtgctcgcrg crgcrgcrgc rgcrgcgstw tkgactactg gggtcaagga 60

<210> 666
<211> 63
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> oligonucleotídeos sintéticos

<400> 666
gtctattatt gtgctcgcrg crgcrgcrgc rgcrgcrgcg stwtkgacta ctggggtcaa 60

gga 63

<210> 667
<211> 66
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> oligonucleotídeos sintéticos

<400> 667
gtctattatt gtgctcgcrg crgcrgcrgc rgcrgcrgcr gcgstwtkga ctactggggt 60

caagga 66

<210> 668
<211> 69
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> oligonucleotídeos sintéticos

<400> 668
gtctattatt gtgctcgcrg crgcrgcrgc rgcrgcrgcr gcrgcgstwt kgactactgg 60

ggtcaagga 69

<210> 669
<211> 72
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> oligonucleotídeos sintéticos

<400> 669
gtctattatt gtgctcgcrg crgcrgcrgc rgcrgcrgcr gcrgcrgcgs twtkgactac 60

tggggtcaag ga 72

<210> 670
<211> 75
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> oligonucleotídeos sintéticos

<400> 670
gtctattatt gtgctcgcrg crgcrgcrgc rgcrgcrgcr gcrgcrgcrg cgstwtkgac 60

tactggggtc aagga 75

<210> 671
<211> 78
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> oligonucleotídeos sintéticos

<400> 671
gtctattatt gtgctcgcrg crgcrgcrgc rgcrgcrgcr gcrgcrgcrg crgcgstwtk 60

gactactggg gtcaagga 78

<210> 672
<211> 81
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> oligonucleotídeos sintéticos

<400> 672
gtctattatt gtgctcgcrg crgcrgcrgc rgcrgcrgcr gcrgcrgcrg crgcrgcgst 60

wtkgactact ggggtcaagg a 81

<210> 673
<211> 84
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> oligonucleotídeos sintéticos

<400> 673
gtctattatt gtgctcgcrg crgcrgcrgc rgcrgcrgcr gcrgcrgcrg crgcrgcrgc 60

gstwtkgact actggggtca agga 84

<210> 674
<211> 87
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> oligonucleotídeos sintéticos

<400> 674
gtctattatt gtgctcgcrg crgcrgcrgc rgcrgcrgcr gcrgcrgcrg crgcrgcrgc 60

rgcgstwtkg actactgggg tcaagga 87

<210> 675
<211> 90
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> oligonucleotídeos sintéticos

<400> 675

gtctattatt gtgctcgcrg crgcrgcrgc rgcrgcrgcr gcrgcrgcrg crgcrgcrgc 60

rgcrgcgstw tkgactactg gggtcaagga 90

<210> 676
<211> 93
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> oligonucleotídeos sintéticos

<400> 676
gtctattatt gtgctcgcrg crgcrgcrgc rgcrgcrgcr gcrgcrgcrg crgcrgcrgc 60

rgcrgcrgcg stwtkgacta ctggggtcaa gga 93

<210> 677
<211> 54
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> oligonucleotídeos sintéticos

<400> 677
gtctattatt gtgctcgcak cakcakcakc gstwtkgact actggggtca agga 54

<210> 678
<211> 57
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> oligonucleotídeos sintéticos

<400> 678
gtctattatt gtgctcgcak cakcakcakc akcgstwtkg actactgggg tcaagga 57

<210> 679
<211> 60
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> oligonucleotídeos sintéticos

<400> 679
gtctattatt gtgctcgcak cakcakcakc akcakcgstw tkgactactg gggtcaagga 60

<210> 680
<211> 63
<212> DNA
<213> Artificial

<220>

<223> oligonucleotídeos sintéticos

<400> 680
gtctattatt gtgctcgcak cakcakcakc akcakcakcg stwtkgacta ctggggtcaa 60

gga 63

<210> 681
<211> 66
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> oligonucleotídeos sintéticos

<400> 681
gtctattatt gtgctcgcak cakcakcakc akcakcakca kcgstwtkga ctactggggt 60

caagga 66

<210> 682
<211> 69
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> oligonucleotídeos sintéticos

<400> 682
gtctattatt gtgctcgcak cakcakcakc akcakcakca kcakcgstwt kgactactgg 60

ggtcaagga 69

<210> 683
<211> 72
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> oligonucleotídeos sintéticos

<400> 683
gtctattatt gtgctcgcak cakcakcakc akcakcakca kcakcakcgs twtkgactac 60

tggggtcaag ga 72

<210> 684
<211> 75
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> oligonucleotídeos sintéticos

<400> 684
gtctattatt gtgctcgcak cakcakcakc akcakcakca kcakcakcak cgstwtkgac 60

tactggggtc aagga 75

<210> 685
<211> 78
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> oligonucleotídeos sintéticos

<400> 685
gtctattatt gtgctcgcak cakcakcakc akcakcakca kcakcakcak cakcgstwtk 60

gactactggg gtcaagga 78

<210> 686
<211> 81
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> oligonucleotídeos sintéticos

<400> 686
gtctattatt gtgctcgcak cakcakcakc akcakcakca kcakcakcak cakcakcgst 60

wtkgactact ggggtcaagg a 81

<210> 687
<211> 84
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> oligonucleotídeos sintéticos

<400> 687
gtctattatt gtgctcgcak cakcakcakc akcakcakca kcakcakcak cakcakcakc 60

gstwtkgact actggggtca agga 84

<210> 688
<211> 87
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> oligonucleotídeos sintéticos

<400> 688
gtctattatt gtgctcgcak cakcakcakc akcakcakca kcakcakcak cakcakcakc 60

akcgstwtkg actactgggg tcaagga 87

<210> 689
<211> 90

<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> oligonucleotídeos sintéticos

<400> 689
gtctattatt gtgctcgcak cakcakcakc akcakcakca kcakcakcak cakcakcakc 60

akcakcgstw tkgactactg gggtcaagga 90

<210> 690
<211> 93
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> oligonucleotídeos sintéticos

<400> 690
gtctattatt gtgctcgcak cakcakcakc akcakcakca kcakcakcak cakcakcakc 60

akcakcakcg stwtkgacta ctggggtcaa gga 93

<210> 691
<211> 54
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> oligonucleotídeos sintéticos

<400> 691
gtctattatt gtgctcgcty atyatyatya gstwtkgact actggggtca agga 54

<210> 692
<211> 57
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> oligonucleotídeos sintéticos

<400> 692
gtctattatt gtgctcgcty atyatyatya tyagstwtkg actactgggg tcaagga 57

<210> 693
<211> 60
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> oligonucleotídeos sintéticos

<400> 693
gtctattatt gtgctcgcty atyatyatya tyatyagstw tkgactactg gggtcaagga 60

<210> 694
<211> 63
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> oligonucleotídeos sintéticos

<400> 694
gtctattatt gtgctcgcty atyatyatya tyatyatyag stwtkgacta ctggggtcaa 60

gga 63

<210> 695
<211> 66
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> oligonucleotídeos sintéticos

<400> 695
gtctattatt gtgctcgcty atyatyatya tyatyatyat yagstwtkga ctactggggt 60

caagga 66

<210> 696
<211> 69
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> oligonucleotídeos sintéticos

<400> 696
gtctattatt gtgctcgcty atyatyatya tyatyatyat yatyagstwt kgactactgg 60

ggtcaagga 69

<210> 697
<211> 72
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> oligonucleotídeos sintéticos

<400> 697
gtctattatt gtgctcgcty atyatyatya tyatyatyat yatyatyags twtkgactac 60

tggggtcaag ga 72

<210> 698
<211> 75
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> oligonucleotídeos sintéticos

<400> 698
gtctattatt gtgctcgcty atyatyatya tyatyatyat yatyatyaty agstwtkgac 60

tactggggtc aagga 75

<210> 699
<211> 78
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> oligonucleotídeos sintéticos

<400> 699
gtctattatt gtgctcgcty atyatyatya tyatyatyat yatyatyaty atyagstwtk 60

gactactggg gtcaagga 78

<210> 700
<211> 81
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> oligonucleotídeos sintéticos

<400> 700
gtctattatt gtgctcgcty atyatyatya tyatyatyat yatyatyaty atyatyagst 60

wtkgactact ggggtcaagg a 81

<210> 701
<211> 84
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> oligonucleotídeos sintéticos

<400> 701
gtctattatt gtgctcgcty atyatyatya tyatyatyat yatyatyaty atyatyatya 60

gstwtkgact actggggtca agga 84

<210> 702
<211> 87
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> oligonucleotídeos sintéticos

<400> 702

gtctattatt gtgctcgcty atyatyatya tyatyatyat yatyatyaty atyatyatya 60

tyagstwtkg actactgggg tcaagga 87

<210> 703
<211> 90
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> oligonucleotídeos sintéticos

<400> 703
gtctattatt gtgctcgcty atyatyatya tyatyatyat yatyatyaty atyatyatya 60

tyatyagstw tkgactactg gggtcaagga 90

<210> 704
<211> 93
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> oligonucleotídeos sintéticos

<400> 704
gtctattatt gtgctcgcty atyatyatya tyatyatyat yatyatyaty atyatyatya 60

tyatyatyag stwtkgacta ctggggtcaa gga 93

<210> 705
<211> 54
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> oligonucleotídeos sintéticos

<400> 705
gtctattatt gtgctcgcar carcarcarc gstwtkgact actggggtca agga 54

<210> 706
<211> 57
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> oligonucleotídeos sintéticos

<400> 706
gtctattatt gtgctcgcar carcarcarc arcgstwtkg actactgggg tcaagga 57

<210> 707
<211> 60
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> oligonucleotídeos sintéticos

<400> 707
gtctattatt gtgctcgcar carcarcarc arcarcgstw tkgactactg gggtcaagga 60

<210> 708
<211> 63
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> oligonucleotídeos sintéticos

<400> 708
gtctattatt gtgctcgcar carcarcarc arcarcarcg stwtkgacta ctggggtcaa 60

gga 63

<210> 709
<211> 66
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> oligonucleotídeos sintéticos

<400> 709
gtctattatt gtgctcgcar carcarcarc arcarcarca rcgstwtkga ctactggggt 60

caagga 66

<210> 710
<211> 69
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> oligonucleotídeos sintéticos

<400> 710
gtctattatt gtgctcgcar carcarcarc arcarcarca rcarcgstwt kgactactgg 60

ggtcaagga 69

<210> 711
<211> 72
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> oligonucleotídeos sintéticos

<400> 711
gtctattatt gtgctcgcar carcarcarc arcarcarca rcarcarcgs twtkgactac 60

tggggtcaag ga 72

<210> 712
<211> 75
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> oligonucleotídeos sintéticos

<400> 712
gtctattatt gtgctcgcar carcarcarc arcarcarca rcarcarcar cgstwtkgac 60

tactggggtc aagga 75

<210> 713
<211> 78
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> oligonucleotídeos sintéticos

<400> 713
gtctattatt gtgctcgcar carcarcarc arcarcarca rcarcarcar carcgstwtk 60

gactactggg gtcaagga 78

<210> 714
<211> 81
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> oligonucleotídeos sintéticos

<400> 714
gtctattatt gtgctcgcar carcarcarc arcarcarca rcarcarcar carcarcgst 60

wtkgactact ggggtcaagg a 81

<210> 715
<211> 84
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> oligonucleotídeos sintéticos

<400> 715
gtctattatt gtgctcgcar carcarcarc arcarcarca rcarcarcar carcarcarc 60

gstwtkgact actggggtca agga 84

<210> 716
<211> 87

<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> oligonucleotídeos sintéticos

<400> 716
gtctattatt gtgctcgcar carcarcarc arcarcarca rcarcarcar carcarcarc 60

arcgstwtkg actactgggg tcaagga 87

<210> 717
<211> 90
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> oligonucleotídeos sintéticos

<400> 717
gtctattatt gtgctcgcar carcarcarc arcarcarca rcarcarcar carcarcarc 60

arcarcgstw tkgactactg gggtcaagga 90

<210> 718
<211> 93
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> oligonucleotídeos sintéticos

<400> 718
gtctattatt gtgctcgcar carcarcarc arcarcarca rcarcarcar carcarcarc 60

arcarcarcg stwtkgacta ctggggtcaa gga 93

<210> 719
<211> 54
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> oligonucleotídeos sintéticos

<400> 719
gtctattatt gtgctcgcyc tyctyctyct gstwtkgact actggggtca agga 54

<210> 720
<211> 57
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> oligonucleotídeos sintéticos

<400> 720
gtctattatt gtgctcgcyc tyctyctyct yctgstwtkg actactgggg tcaagga 57

<210> 721
<211> 60
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> oligonucleotídeos sintéticos

<400> 721
gtctattatt gtgctcgcyc tyctyctyct yctyctgstw tkgactactg gggtcaagga 60

<210> 722
<211> 63
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> oligonucleotídeos sintéticos

<400> 722
gtctattatt gtgctcgcyc tyctyctyct yctyctyctg stwtkgacta ctggggtcaa 60

gga 63

<210> 723
<211> 66
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> oligonucleotídeos sintéticos

<400> 723
gtctattatt gtgctcgcyc tyctyctyct yctyctycty ctgstwtkga ctactggggt 60

caagga 66

<210> 724
<211> 69
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> oligonucleotídeos sintéticos

<400> 724
gtctattatt gtgctcgcyc tyctyctyct yctyctycty ctyctgstwt kgactactgg 60

ggtcaagga 69

<210> 725
<211> 72
<212> DNA

<213> Artificial

<220>
<223> oligonucleotídeos sintéticos

<400> 725
gtctattatt gtgctcgcyc tyctyctyct yctyctycty ctyctyctgs twtkgactac 60

tggggtcaag ga 72

<210> 726
<211> 75
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> oligonucleotídeos sintéticos

<400> 726
gtctattatt gtgctcgcyc tyctyctyct yctyctycty ctyctyctyc tgstwtkgac 60

tactggggtc aagga 75

<210> 727
<211> 78
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> oligonucleotídeos sintéticos

<400> 727
gtctattatt gtgctcgcyc tyctyctyct yctyctycty ctyctyctyc tyctgstwtk 60

gactactggg gtcaagga 78

<210> 728
<211> 81
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> oligonucleotídeos sintéticos

<400> 728
gtctattatt gtgctcgcyc tyctyctyct yctyctycty ctyctyctyc tyctyctgst 60

wtkgactact ggggtcaagg a 81

<210> 729
<211> 84
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> oligonucleotídeos sintéticos

<400> 729
gtctattatt gtgctcgcyc tyctyctyct yctyctycty ctyctyctyc tyctyctyct 60

gstwtkgact actggggtca agga 84

<210> 730
<211> 87
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> oligonucleotídeos sintéticos

<400> 730
gtctattatt gtgctcgcyc tyctyctyct yctyctycty ctyctyctyc tyctyctyct 60

yctgstwtkg actactgggg tcaagga 87

<210> 731
<211> 90
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> oligonucleotídeos sintéticos

<400> 731
gtctattatt gtgctcgcyc tyctyctyct yctyctycty ctyctyctyc tyctyctyct 60

yctyctgstw tkgactactg gggtcaagga 90

<210> 732
<211> 93
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> oligonucleotídeos sintéticos

<400> 732
gtctattatt gtgctcgcyc tyctyctyct yctyctycty ctyctyctyc tyctyctyct 60

yctyctyctg stwtkgacta ctggggtcaa gga 93

<210> 733
<211> 54
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> oligonucleotídeos sintéticos

<400> 733
gtctattatt gtgctcgcmg cmgcmgcmgc gstwtkgact actggggtca agga 54

<210> 734

<211> 57
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> oligonucleotídeos sintéticos

<400> 734
gtctattatt gtgctcgcmg cmgcmgcmgc mgcgstwtkg actactgggg tcaagga 57

<210> 735
<211> 60
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> oligonucleotídeos sintéticos

<400> 735
gtctattatt gtgctcgcmg cmgcmgcmgc mgcmgcgstw tkgactactg gggtcaagga 60

<210> 736
<211> 63
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> oligonucleotídeos sintéticos

<400> 736
gtctattatt gtgctcgcmg cmgcmgcmgc mgcmgcmgcg stwtkgacta ctggggtcaa 60

gga 63

<210> 737
<211> 66
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> oligonucleotídeos sintéticos

<400> 737
gtctattatt gtgctcgcmg cmgcmgcmgc mgcmgcmgcm gcgstwtkga ctactggggt 60

caagga 66

<210> 738
<211> 69
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> oligonucleotídeos sintéticos

<400> 738

gtctattatt gtgctcgcmg cmgcmgcmgc mgcmgcmgcm gcmgcgstwt kgactactgg 60

ggtcaagga 69

<210> 739
<211> 72
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> oligonucleotídeos sintéticos

<400> 739
gtctattatt gtgctcgcmg cmgcmgcmgc mgcmgcmgcm gcmgcmgcgs twtkgactac 60

tggggtcaag ga 72

<210> 740
<211> 75
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> oligonucleotídeos sintéticos

<400> 740
gtctattatt gtgctcgcmg cmgcmgcmgc mgcmgcmgcm gcmgcmgcmg cgstwtkgac 60

tactggggtc aagga 75

<210> 741
<211> 78
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> oligonucleotídeos sintéticos

<400> 741
gtctattatt gtgctcgcmg cmgcmgcmgc mgcmgcmgcm gcmgcmgcmg cmgcgstwtk 60

gactactggg gtcaagga 78

<210> 742
<211> 81
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> oligonucleotídeos sintéticos

<400> 742
gtctattatt gtgctcgcmg cmgcmgcmgc mgcmgcmgcm gcmgcmgcmg cmgcmgcgst 60

wtkgactact ggggtcaagg a 81

<210> 743
<211> 84
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> oligonucleotídeos sintéticos

<400> 743
gtctattatt gtgctcgcmg cmgcmgcmgc mgcmgcmgcm gcmgcmgcmg cmgcmgcmgc 60

gstwtkgact actggggtca agga 84

<210> 744
<211> 87
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> oligonucleotídeos sintéticos

<400> 744
gtctattatt gtgctcgcmg cmgcmgcmgc mgcmgcmgcm gcmgcmgcmg cmgcmgcmgc 60

mgcgstwtkg actactgggg tcaagga 87

<210> 745
<211> 90
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> oligonucleotídeos sintéticos

<400> 745
gtctattatt gtgctcgcmg cmgcmgcmgc mgcmgcmgcm gcmgcmgcmg cmgcmgcmgc 60

mgcmgcgstw tkgactactg gggtcaagga 90

<210> 746
<211> 93
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> oligonucleotídeos sintéticos

<400> 746
gtctattatt gtgctcgcmg cmgcmgcmgc mgcmgcmgcm gcmgcmgcmg cmgcmgcmgc 60

mgcmgcmgcg stwtkgacta ctggggtcaa gga 93

<210> 747
<211> 54
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> oligonucleotídeos sintéticos

<400> 747
gtctattatt gtgctcgcas cascascasc gstwtkgact actggggtca agga 54

<210> 748
<211> 57
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> oligonucleotídeos sintéticos

<400> 748
gtctattatt gtgctcgcas cascascasc ascgstwtkg actactgggg tcaagga 57

<210> 749
<211> 60
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> oligonucleotídeos sintéticos

<400> 749
gtctattatt gtgctcgcas cascascasc ascascgstw tkgactactg gggtcaagga 60

<210> 750
<211> 63
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> oligonucleotídeos sintéticos

<400> 750
gtctattatt gtgctcgcas cascascasc ascascascg stwtkgacta ctggggtcaa 60

gga 63

<210> 751
<211> 66
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> oligonucleotídeos sintéticos

<400> 751
gtctattatt gtgctcgcas cascascasc ascascasca scgstwtkga ctactggggt 60

caagga 66

<210> 752

<211> 69
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> oligonucleotídeos sintéticos

<400> 752
gtctattatt gtgctcgcas cascascasc ascascasca scascgstwt kgactactgg 60

ggtcaagga 69

<210> 753
<211> 72
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> oligonucleotídeos sintéticos

<400> 753
gtctattatt gtgctcgcas cascascasc ascascasca scascascgs twtkgactac 60

tggggtcaag ga 72

<210> 754
<211> 75
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> oligonucleotídeos sintéticos

<400> 754
gtctattatt gtgctcgcas cascascasc ascascasca scascascas cgstwtkgac 60

tactggggtc aagga 75

<210> 755
<211> 78
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> oligonucleotídeos sintéticos

<400> 755
gtctattatt gtgctcgcas cascascasc ascascasca scascascas cascgstwtk 60

gactactggg gtcaagga 78

<210> 756
<211> 81
<212> DNA
<213> Artificial
<220>

<223> oligonucleotídeos sintéticos

<400> 756
gtctattatt gtgctcgcas cascascasc ascascasca scascascas cascascgst 60

wtkgactact ggggtcaagg a 81

<210> 757
<211> 84
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> oligonucleotídeos sintéticos

<400> 757
gtctattatt gtgctcgcas cascascasc ascascasca scascascas cascascasc 60

gstwtkgact actggggtca agga 84

<210> 758
<211> 87
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> oligonucleotídeos sintéticos

<400> 758
gtctattatt gtgctcgcas cascascasc ascascasca scascascas cascascasc 60

ascgstwtkg actactgggg tcaagga 87

<210> 759
<211> 90
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> oligonucleotídeos sintéticos

<400> 759
gtctattatt gtgctcgcas cascascasc ascascasca scascascas cascascasc 60

ascascgstw tkgactactg gggtcaagga 90

<210> 760
<211> 93
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> oligonucleotídeos sintéticos

<400> 760
gtctattatt gtgctcgcas cascascasc ascascasca scascascas cascascasc 60

ascascascg stwtkgacta ctggggtcaa gga 93

<210> 761
<211> 54
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> oligonucleotídeos sintéticos

<400> 761
gtctattatt gtgctcgcts gtsgtsgtsg gstwtkgact actggggtca agga 54

<210> 762
<211> 57
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> oligonucleotídeos sintéticos

<400> 762
gtctattatt gtgctcgcts gtsgtsgtsg tsggstwtkg actactgggg tcaagga 57

<210> 763
<211> 60
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> oligonucleotídeos sintéticos

<400> 763
gtctattatt gtgctcgcts gtsgtsgtsg tsgtsggstw tkgactactg gggtcaagga 60

<210> 764
<211> 63
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> oligonucleotídeos sintéticos

<400> 764
gtctattatt gtgctcgcts gtsgtsgtsg tsgtsgtsgg stwtkgacta ctggggtcaa 60

gga 63

<210> 765
<211> 66
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> oligonucleotídeos sintéticos
<400> 765

gtctattatt gtgctcgcts gtsgtsgtsg tsgtsgtsgt sggstwtkga ctactggggt 60

caagga 66

<210> 766
<211> 69
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> oligonucleotídeos sintéticos

<400> 766
gtctattatt gtgctcgcts gtsgtsgtsg tsgtsgtsgt sgtsggstwt kgactactgg 60

ggtcaagga 69

<210> 767
<211> 72
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> oligonucleotídeos sintéticos

<400> 767
gtctattatt gtgctcgcts gtsgtsgtsg tsgtsgtsgt sgtsgtsggs twtkgactac 60

tggggtcaag ga 72

<210> 768
<211> 75
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> oligonucleotídeos sintéticos

<400> 768
gtctattatt gtgctcgcts gtsgtsgtsg tsgtsgtsgt sgtsgtsgts ggstwtkgac 60

tactggggtc aagga 75

<210> 769
<211> 78
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> oligonucleotídeos sintéticos

<400> 769
gtctattatt gtgctcgcts gtsgtsgtsg tsgtsgtsgt sgtsgtsgts gtsggstwtk 60

gactactggg gtcaagga 78

<210> 770
<211> 81
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> oligonucleotídeos sintéticos

<400> 770
gtctattatt gtgctcgcts gtsgtsgtsg tsgtsgtsgt sgtsgtsgts gtsgtsggst 60

wtkgactact ggggtcaagg a 81

<210> 771
<211> 84
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> oligonucleotídeos sintéticos

<400> 771
gtctattatt gtgctcgcts gtsgtsgtsg tsgtsgtsgt sgtsgtsgts gtsgtsgtsg 60

gstwtkgact actggggtca agga 84

<210> 772
<211> 87
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> oligonucleotídeos sintéticos

<400> 772
gtctattatt gtgctcgcts gtsgtsgtsg tsgtsgtsgt sgtsgtsgts gtsgtsgtsg 60

tsggstwtkg actactgggg tcaagga 87

<210> 773
<211> 90
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> oligonucleotídeos sintéticos

<400> 773
gtctattatt gtgctcgcts gtsgtsgtsg tsgtsgtsgt sgtsgtsgts gtsgtsgtsg 60

tsgtsggstw tkgactactg gggtcaagga 90

<210> 774
<211> 93
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> oligonucleotídeos sintéticos

<400> 774
gtctattatt gtgctcgcts gtsgtsgtsg tsgtsgtsgt sgtsgtsgts gtsgtsgtsg 60

tsgtsgtsgg stwtkgacta ctggggtcaa gga 93

<210> 775
<211> 54
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> oligonucleotídeos sintéticos

<400> 775
gtctattatt gtgctcgctm ttmttmttmt gstwtkgact actggggtca agga 54

<210> 776
<211> 57
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> oligonucleotídeos sintéticos

<400> 776
gtctattatt gtgctcgctm ttmttmttmt tmtgstwtkg actactgggg tcaagga 57

<210> 777
<211> 60
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> synthetic oligonucleotides

<400> 777
gtctattatt gtgctcgctm ttmttmttmt tmttmtgstw tkgactactg gggtcaagga 60

<210> 778
<211> 63
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> oligonucleotídeos sintéticos

<400> 778
gtctattatt gtgctcgctm ttmttmttmt tmttmttmtg stwtkgacta ctggggtcaa 60

gga 63

<210> 779
<211> 66

<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> oligonucleotídeos sintéticos

<400> 779
gtctattatt gtgctcgctm ttmttmttmt tmttmttmtt mtgstwtkga ctactggggt 60

caagga 66

<210> 780
<211> 69
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> oligonucleotídeos sintéticos

<400> 780
gtctattatt gtgctcgctm ttmttmttmt tmttmttmtt mttmtgstwt kgactactgg 60

ggtcaagga 69

<210> 781
<211> 72
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> oligonucleotídeos sintéticos

<400> 781
gtctattatt gtgctcgctm ttmttmttmt tmttmttmtt mttmttmtgs twtkgactac 60

tggggtcaag ga 72

<210> 782
<211> 75
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> oligonucleotídeos sintéticos

<400> 782
gtctattatt gtgctcgctm ttmttmttmt tmttmttmtt mttmttmttm tgstwtkgac 60

tactggggtc aagga 75

<210> 783
<211> 78
<212> DNA
<213> Artificial

<220>

<223> oligonucleotídeos sintéticos

<400> 783
gtctattatt gtgctcgctm ttmttmttmt tmttmttmtt mttmttmttm ttmtgstwtk 60

gactactggg gtcaagga 78

<210> 784
<211> 81
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> oligonucleotídeos sintéticos

<400> 784
gtctattatt gtgctcgctm ttmttmttmt tmttmttmtt mttmttmttm ttmttmtgst 60

wtkgactact ggggtcaagg a 81

<210> 785
<211> 84
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> oligonucleotídeos sintéticos

<400> 785
gtctattatt gtgctcgctm ttmttmttmt tmttmttmtt mttmttmttm ttmttmttmt 60

gstwtkgact actggggtca agga 84

<210> 786
<211> 87
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> oligonucleotídeos sintéticos

<400> 786
gtctattatt gtgctcgctm ttmttmttmt tmttmttmtt mttmttmttm ttmttmttmt 60

tmtgstwtkg actactgggg tcaagga 87

<210> 787
<211> 90
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> oligonucleotídeos sintéticos

<400> 787
gtctattatt gtgctcgctm ttmttmttmt tmttmttmtt mttmttmttm ttmttmttmt 60

tmttmtgstw tkgactactg gggtcaagga 90

<210> 788
<211> 93
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> oligonucleotídeos sintéticos

<400> 788
gtctattatt gtgctcgctm ttmttmttmt tmttmttmtt mttmttmttm ttmttmttmt 60

tmttmttmtg stwtkgacta ctggggtcaa gga 93

<210> 789
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> CDRL3 sintético

<400> 789

Gln Gln Ser Tyr Tyr Ser Pro Ser Thr
1 5

<210> 790
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> CDRL3 sintético

<400> 790

Gln Gln Ser Tyr Tyr Ser Pro Ser Thr
1 5

<210> 791
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> CDRL3 sintético

<400> 791

Gln Gln Ser Tyr Tyr Tyr Pro Ser Thr
1 5

<210> 792
<211> 9

<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> CDRL3 sintético

<400> 792

Gln Gln Ser Tyr Tyr Ser Pro Ser Thr
1 5

<210> 793
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> CDRL3 sintético

<400> 793

Gln Gln Ser Tyr Tyr Ser Pro Ser Thr
1 5

<210> 794
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> CDRL3 sintético

<400> 794

Gln Gln Tyr Tyr Tyr Ser Pro Ser Thr
1 5

<210> 795
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> CDRL3 sintético

<400> 795

Gln Gln Ser Tyr Tyr Tyr Pro Ser Thr
1 5

<210> 796
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial

<220>

<223> CDRL3 sintético

<400> 796

Gln Gln Ser Tyr Tyr Tyr Pro Ser Thr
1 5

<210> 797
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> CDRL3 sintético

<400> 797

Gln Gln Ser Tyr Tyr Ser Pro Ser Thr
1 5

<210> 798
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> CDRL3 sintético

<400> 798

Gln Gln Ser Tyr Tyr Ser Pro Ser Thr
1 5

<210> 799
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> CDRL3 sintético

<400> 799

Gln Gln Ser Tyr Tyr Tyr Pro Ser Thr
1 5

<210> 800
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> CDRL3 sintético

<400> 800

Gln Gln Tyr Tyr Tyr Ser Pro Ser Thr
1 5

<210> 801
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> CDRL3 sintético

<400> 801

Gln Gln Ser Tyr Tyr Tyr Pro Ser Thr
1 5

<210> 802
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> CDRL3 sintético

<400> 802

Gln Gln Tyr Tyr Tyr Tyr Pro Tyr Thr
1 5

<210> 803
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> CDRL3 sintético

<400> 803

Gln Gln Ser Tyr Tyr Ser Pro Ser Thr
1 5

<210> 804
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> CDRL3 sintético

<400> 804

Gln Gln Tyr Tyr Tyr Tyr Pro Ser Thr
1 5

<210> 805

<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> CDRL3 sintético

<400> 805

Gln Gln Ser Tyr Tyr Tyr Pro Ser Thr
1 5

<210> 806
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> CDRL3 sintético

<400> 806

Gln Gln Tyr Tyr Tyr Ser Pro Ser Thr
1 5

<210> 807
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> CDRL3 sintético

<400> 807

Gln Gln Ser Tyr Tyr Ser Pro Ser Thr
1 5

<210> 808
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> CDRL3 sintético

<400> 808

Gln Gln Tyr Tyr Tyr Ser Pro Ser Thr
1 5

<210> 809
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial
<220>

<223> CDRL3 sintético

<400> 809

Gln Gln Ser Tyr Tyr Tyr Pro Ser Thr
1 5

<210> 810
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> CDRL3 sintético

<400> 810

Gln Gln Ser Tyr Tyr Ser Pro Ser Thr
1 5

<210> 811
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> CDRL3 sintético

<400> 811

Gln Gln Ser Tyr Tyr Ser Pro Ser Thr
1 5

<210> 812
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> CDRL3 sintético

<400> 812

Gln Gln Tyr Ser Tyr Tyr Pro Tyr Thr
1 5

<210> 813
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> CDRL3 sintético

<400> 813

Gln Gln Tyr Ser Ser Tyr Pro Tyr Thr
1 5

<210> 814
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> CDRL3 sintético

<400> 814

Gln Gln Tyr Ser Tyr Tyr Pro Tyr Thr
1 5

<210> 815
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> CDRL3 sintético

<400> 815

Gln Gln Ser Tyr Ser Ser Pro Tyr Thr
1 5

<210> 816
<211> 10
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> CDRH1 sintético

<400> 816

Gly Phe Tyr Ile Ser Ser Ser Tyr Ile His
1 5 10

<210> 817
<211> 10
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> CDRH1 sintético

<400> 817

Gly Phe Tyr Ile Ser Ser Ser Tyr Ile His
1 5 10

<210> 818

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

<220>
<223> CDRH1 sintético

<400> 818

Gly Phe Ser Ile Ser Ser Ser Tyr Ile His
1 5 10

<210> 819
<211> 10
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> CDRH1 sintético

<400> 819

Gly Phe Ser Ile Ser Tyr Ser Tyr Ile His
1 5 10

<210> 820
<211> 10
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> CDRH1 sintético

<400> 820

Gly Phe Ser Ile Ser Ser Ser Tyr Ile His
1 5 10

<210> 821
<211> 10
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> CDRH1 sintético

<400> 821

Gly Phe Ser Ile Tyr Ser Ser Tyr Ile His
1 5 10

<210> 822
<211> 10
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> CDRH1 sintético

<400> 822

Gly Phe Ser Ile Ser Tyr Ser Tyr Ile His
1 5 10

<210> 823
<211> 10
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> CDRH1 sintético

<400> 823

Gly Phe Ser Ile Ser Ser Ser Tyr Ile His
1 5 10

<210> 824
<211> 10
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> CDRH1 sintético

<400> 824

Gly Phe Ser Ile Tyr Tyr Ser Tyr Ile His
1 5 10

<210> 825
<211> 10
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> CDRH1 sintético

<400> 825

Gly Phe Ser Ile Tyr Tyr Ser Tyr Ile His
1 5 10

<210> 826
<211> 10
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> CDRH1 sintético

<400> 826

Gly Phe Ser Ile Tyr Ser Ser Tyr Ile His
1 5 10

<210> 827
<211> 10
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> CDRH1 sintético

<400> 827

Gly Phe Ser Ile Ser Tyr Ser Tyr Ile His
1 5 10

<210> 828
<211> 10
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> CDRH1 sintético

<400> 828

Gly Phe Ser Ile Tyr Tyr Ser Tyr Ile His
1 5 10

<210> 829
<211> 10
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> CDRH1 sintético

<400> 829

Gly Phe Ser Ile Tyr Tyr Ser Tyr Ile His
1 5 10

<210> 830
<211> 10
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> CDRH1 sintético

<400> 830

Gly Phe Ser Ile Ser Ser Ser Tyr Ile His
1 5 10

<210> 831

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

<220>
<223> CDRH1 sintético

<400> 831

Gly Phe Ser Ile Ser Tyr Ser Tyr Ile His
1 5 10

<210> 832
<211> 10
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> CDRH1 sintético

<400> 832

Gly Phe Tyr Ile Tyr Ser Ser Tyr Ile His
1 5 10

<210> 833
<211> 10
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> CDRH1 sintético

<400> 833

Gly Phe Ser Ile Ser Ser Ser Tyr Ile His
1 5 10

<210> 834
<211> 10
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> CDRH1 sintético

<400> 834

Gly Phe Ser Ile Ser Ser Ser Tyr Ile His
1 5 10

<210> 835
<211> 10
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> CDRH1 sintético

<400> 835

Gly Phe Ser Ile Tyr Ser Ser Tyr Ile His
1 5 10

<210> 836
<211> 10
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> CDRH1 sintético

<400> 836

Gly Phe Ser Ile Ser Ser Ser Tyr Ile His
1 5 10

<210> 837
<211> 10
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> CDRH1 sintético

<400> 837

Gly Phe Tyr Ile Ser Tyr Ser Tyr Ile His
1 5 10

<210> 838
<211> 10
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> CDRH1 sintético

<400> 838

Gly Phe Ser Ile Ser Tyr Ser Tyr Ile His
1 5 10

<210> 839
<211> 10
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> CDRH1 sintético

<400> 839

Gly Phe Ser Ile Ser Tyr Ser Ser Ile His
1 5 10

<210> 840
<211> 10
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> CDRH1 sintético

<400> 840

Gly Phe Ser Ile Ser Tyr Ser Ser Ile His
1 5 10

<210> 841
<211> 10
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> CDRH1 sintético

<400> 841

Gly Phe Ser Ile Ser Tyr Ser Ser Ile His
1 5 10

<210> 842
<211> 10
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> CDRH1 sintético

<400> 842

Gly Phe Ser Ile Ser Ser Ser Ser Ile His
1 5 10

<210> 843
<211> 17
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> CDRH2 sintético

<400> 843

Ser Ile Tyr Pro Tyr Ser Gly Tyr Thr Ser Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 844
<211> 17
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> CDRH2 sintético

<400> 844

Ser Ile Tyr Pro Tyr Ser Gly Tyr Thr Ser Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 845
<211> 17
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> CDRH2 sintético

<400> 845

Ser Ile Tyr Pro Tyr Ser Gly Tyr Thr Ser Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 846
<211> 17
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> CDRH2 sintético

<400> 846

Ser Ile Tyr Pro Tyr Ser Gly Tyr Thr Ser Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 847
<211> 17
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> CDRH2 sintético

<400> 847

Ser Ile Tyr Pro Tyr Ser Gly Tyr Thr Ser Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 848
<211> 17
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> CDRH2 sintético

<400> 848

Ser Ile Tyr Pro Tyr Ser Gly Tyr Thr Ser Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 849
<211> 17
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> CDRH2 sintético

<400> 849

Ser Ile Tyr Pro Ser Ser Gly Tyr Thr Ser Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 850
<211> 17
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> CDRH2 sintético

<400> 850

Ser Ile Tyr Pro Tyr Ser Gly Tyr Thr Ser Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 851
<211> 17
<212> PRT
<213> Artificial

<220>

<223> CDRH2 sintético

<400> 851

Ser Ile Tyr Pro Ser Ser Gly Tyr Thr Ser Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 852
<211> 17
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> CDRH2 sintético

<400> 852

Ser Ile Tyr Pro Ser Ser Gly Tyr Thr Ser Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 853
<211> 17
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> CDRH2 sintético

<400> 853

Ser Ile Tyr Pro Tyr Ser Gly Tyr Thr Ser Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 854
<211> 17
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> CDRH2 sintético

<400> 854

Ser Ile Tyr Pro Tyr Ser Gly Tyr Thr Ser Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 855
<211> 17

<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> CDRH2 sintético

<400> 855

Ser Ile Tyr Pro Ser Ser Gly Tyr Thr Ser Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 856
<211> 17
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> CDRH2 sintético

<400> 856

Ser Ile Tyr Pro Ser Ser Gly Tyr Thr Ser Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 857
<211> 17
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> CDRH2 sintético

<400> 857

Ser Ile Tyr Pro Tyr Ser Gly Tyr Thr Ser Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 858
<211> 17
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> CDRH2 sintético

<400> 858

Ser Ile Tyr Pro Tyr Ser Gly Tyr Thr Ser Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 859
<211> 17
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> CDRH2 sintético

<400> 859

Ser Ile Tyr Pro Tyr Ser Gly Tyr Thr Ser Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 860
<211> 17
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> CDRH2 sintético

<400> 860

Ser Ile Tyr Pro Tyr Ser Gly Tyr Thr Ser Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 861
<211> 17
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> CDRH2 sintético

<400> 861

Ser Ile Tyr Pro Tyr Ser Gly Tyr Thr Ser Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 862
<211> 17
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> CDRH2 sintético

<400> 862

Ser Ile Tyr Pro Tyr Ser Gly Tyr Thr Ser Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 863
<211> 17
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> CDRH2 sintético

<400> 863

Ser Ile Tyr Pro Tyr Ser Gly Tyr Thr Ser Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 864
<211> 17
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> CDRH2 sintético

<400> 864

Ser Ile Tyr Pro Tyr Ser Gly Tyr Thr Ser Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 865
<211> 17
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> CDRH2 sintético

<400> 865

Ser Ile Tyr Pro Tyr Ser Gly Tyr Thr Ser Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 866
<211> 17
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> CDRH2 sintético

<400> 866

Ser Ile Tyr Pro Tyr Tyr Gly Tyr Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 867
<211> 17
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> CDRH2 sintético

<400> 867

Ser Ile Tyr Pro Tyr Tyr Gly Tyr Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 868
<211> 17
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> CDRH2 sintético

<400> 868

Ser Ile Tyr Pro Tyr Tyr Gly Tyr Thr Ser Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 869
<211> 17
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> CDRH2 sintético

<400> 869

Tyr Ile Ser Pro Ser Ser Gly Tyr Thr Ser Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 870

<211> 8
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> CDRH3 sintético

<400> 870

Tyr Tyr Ser Tyr Ala Phe Asp Tyr
1 5

<210> 871
<211> 8
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> CDRH3 sintético

<400> 871

Tyr Tyr Ser Ser Gly Phe Asp Tyr
1 5

<210> 872
<211> 8
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> CDRH3 sintético

<400> 872

Tyr Tyr Ser Ser Gly Phe Asp Tyr
1 5

<210> 873
<211> 8
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> CDRH3 sintético

<400> 873

Tyr Tyr Ser Ser Gly Phe Asp Tyr
1 5

<210> 874
<211> 8
<212> PRT
<213> Artificial
<220>

<223> CDRH3 sintético

<400> 874

Tyr Tyr Ser Tyr Ala Leu Asp Tyr
1 5

<210> 875
<211> 8
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> CDRH3 sintético

<400> 875

Trp Trp Ser Ser Ala Phe Asp Tyr
1 5

<210> 876
<211> 8
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> CDRH3 sintético

<400> 876

Trp Trp Ser Ser Ala Met Asp Tyr
1 5

<210> 877
<211> 8
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> CDRH3 sintético

<400> 877

Trp Trp Ser Trp Gly Phe Asp Tyr
1 5

<210> 878
<211> 8
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> CDRH3 sintético

<400> 878

Trp Trp Ser Ser Ala Phe Asp Tyr
1 5

<210> 879
<211> 8
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> CDRH3 sintético

<400> 879

Trp Trp Ser Ser Gly Phe Asp Tyr
1 5

<210> 880
<211> 8
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> CDRH3 sintético

<400> 880

Trp Trp Ser Ser Ala Phe Asp Tyr
1 5

<210> 881
<211> 8
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> CDRH3 sintético

<400> 881

Trp Trp Ser Trp Ala Phe Asp Tyr
1 5

<210> 882
<211> 8
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> CDRH3 sintético

<400> 882

Trp Trp Ser Ser Ala Phe Asp Tyr
1 5

<210> 883

<211> 8
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> CDRH3 sintético

<400> 883

Trp Trp Ser Ser Ala Phe Asp Tyr
1 5

<210> 884
<211> 8
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> CDRH3 sintético

<400> 884

Trp Trp Ser Ser Ala Leu Asp Tyr
1 5

<210> 885
<211> 8
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> CDRH3 sintético

<400> 885

Trp Trp Ser Ser Ala Phe Asp Tyr
1 5

<210> 886
<211> 8
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> CDRH3 sintético

<400> 886

Trp Trp Ser Ser Gly Phe Asp Tyr
1 5

<210> 887
<211> 8
<212> PRT
<213> Artificial
<220>

<223> CDRH3 sintético

<400> 887

Trp Trp Ser Ser Ala Phe Asp Tyr
1 5

<210> 888
<211> 8
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> CDRH3 sintético

<400> 888

Trp Trp Ser Ser Ala Leu Asp Tyr
1 5

<210> 889
<211> 8
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> CDRH3 sintético

<400> 889

Trp Ser Ser Ser Gly Phe Asp Tyr
1 5

<210> 890
<211> 8
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> CDRH3 sintético

<400> 890

Trp Trp Ser Ser Ala Met Asp Tyr
1 5

<210> 891
<211> 8
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> CDRH3 sintético

<400> 891

Trp Trp Ser Ser Ala Leu Asp Tyr
1 5

<210> 892
<211> 8
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> CDRH3 sintético

<400> 892

Trp Trp Ser Ser Ala Leu Asp Tyr
1 5

<210> 893
<211> 12
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> CDRH3 sintético

<400> 893

Phe Ser Phe Ser Ser Ser Ser Phe Ala Met Asp Tyr
1 5 10

<210> 894
<211> 12
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> CDRH3 sintético

<400> 894

Phe Ser Phe Ser Ser Ser Ser Phe Ala Ile Asp Tyr
1 5 10

<210> 895
<211> 13
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> CDRH3 sintético

<400> 895

Phe Phe Phe Phe Ser Ser Ser Phe Phe Gly Phe Asp Tyr
1 5 10

<210> 896

<211> 15
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> CDRH3 sintético

<400> 896

Tyr Tyr Ser Ser Tyr Tyr Ser Tyr Tyr Ser Phe Gly Leu Asp Tyr
1 5 10 15

<210> 897
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> CDRL3 sintético

<400> 897

Gln Gln Ser Trp Trp Trp Pro Trp Thr
1 5

<210> 898
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> CDRL3 sintético

<400> 898

Gln Gln Ser Trp Trp Trp Pro Ser Thr
1 5

<210> 899
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> CDRL3 sintético

<400> 899

Gln Gln Ser Trp Trp Ser Pro Ser Thr
1 5

<210> 900
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial
<220>

<223> CDRL3 sintético

<400> 900

Gln Gln Trp Trp Trp Trp Pro Trp Thr
1 5

<210> 901
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> CDRL3 sintético

<400> 901

Gln Gln Trp Trp Trp Trp Pro Ser Thr
1 5

<210> 902
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> CDRL3 sintético

<400> 902

Gln Gln Ser Trp Trp Trp Pro Ser Thr
1 5

<210> 903
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> CDRL3 sintético

<400> 903

Gln Gln Trp Trp Trp Trp Pro Ser Thr
1 5

<210> 904
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> CDRL3 sintético

<400> 904

Gln Gln Trp Trp Trp Trp Pro Ser Thr
1 5

<210> 905
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> CDRL3 sintético

<400> 905

Gln Gln Trp Trp Trp Trp Pro Ser Thr
1 5

<210> 906
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> CDRL3 sintético

<400> 906

Gln Gln Trp Ser Trp Trp Pro Ser Thr
1 5

<210> 907
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> CDRL3 sintético

<400> 907

Gln Gln Trp Ser Ser Trp Pro Ser Thr
1 5

<210> 908
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> CDRL3 sintético

<400> 908

Gln Gln Trp Ser Ser Trp Pro Ser Thr
1 5

<210> 909

<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> CDRL3 sintético

<400> 909

Gln Gln Ser Ser Ser Ser Pro Ser Thr
1 5

<210> 910
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> CDRL3 sintético

<400> 910

Gln Gln Trp Ser Trp Ser Pro Ser Thr
1 5

<210> 911
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> CDRL3 sintético

<400> 911

Gln Gln Trp Ser Ser Trp Pro Ser Thr
1 5

<210> 912
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> CDRL3 sintético

<400> 912

Gln Gln Trp Ser Ser Trp Pro Ser Thr
1 5

<210> 913
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial
<220>

<223> CDRL3 sintético

<400> 913

Gln Gln Ser Tyr Tyr Ser Pro Ser Thr
1 5

<210> 914
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> CDRL3 sintético

<400> 914

Gln Gln Tyr Tyr Tyr Ser Pro Ser Thr
1 5

<210> 915
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> CDRL3 sintético

<400> 915

Gln Gln Ser Tyr Tyr Tyr Pro Ser Thr
1 5

<210> 916
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> CDRL3 sintético

<400> 916

Gln Gln Ser Tyr Tyr Tyr Pro Ser Thr
1 5

<210> 917
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> CDRL3 sintético

<400> 917

Gln Gln Ser Tyr Tyr Tyr Pro Ser Thr
1 5

<210> 918
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> CDRL3 sintético

<400> 918

Gln Gln Ser Tyr Tyr Tyr Pro Ser Thr
1 5

<210> 919
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> CDRL3 sintético

<400> 919

Gln Gln Ser Tyr Tyr Ser Pro Ser Thr
1 5

<210> 920
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> CDRL3 sintético

<400> 920

Gln Gln Ser Ser Ser Ser Pro Ser Thr
1 5

<210> 921
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> CDRL3 sintético

<400> 921

Gln Gln Ser Tyr Ser Tyr Pro Tyr Thr
1 5

<210> 922

<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> CDRL3 sintético

<400> 922

Gln Gln Tyr Tyr Ser Ser Pro Tyr Thr
1 5

<210> 923
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> CDRL3 sintético

<400> 923

Gln Gln Tyr Tyr Ser Ser Pro Tyr Thr
1 5

<210> 924
<211> 10
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> CDRH1 sintético

<400> 924

Gly Phe Ser Ile Trp Trp Ser Trp Ile His
1 5 10

<210> 925
<211> 10
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> CDRH1 sintético

<400> 925

Gly Phe Ser Ile Trp Trp Ser Trp Ile His
1 5 10

<210> 926
<211> 10
<212> PRT
<213> Artificial
<220>

<223> CDRH1 sintético

<400> 926

Gly Phe Ser Ile Trp Trp Ser Trp Ile His
1 5 10

<210> 927
<211> 10
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> CDRH1 sintético

<400> 927

Gly Phe Ser Ile Trp Trp Ser Trp Ile His
1 5 10

<210> 928
<211> 10
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> CDRH1 sintético

<400> 928

Gly Phe Ser Ile Trp Ser Ser Trp Ile His
1 5 10

<210> 929
<211> 10
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> CDRH1 sintético

<400> 929

Gly Phe Ser Ile Trp Trp Ser Trp Ile His
1 5 10

<210> 930
<211> 10
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> CDRH1 sintético

<400> 930

Gly Phe Ser Ile Ser Trp Ser Trp Ile His
1 5 10

<210> 931
<211> 10
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> CDRH1 sintético

<400> 931

Gly Phe Ser Ile Trp Trp Ser Trp Ile His
1 5 10

<210> 932
<211> 10
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> CDRH1 sintético

<400> 932

Gly Phe Ser Ile Trp Trp Ser Trp Ile His
1 5 10

<210> 933
<211> 10
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> CDRH1 sintético

<400> 933

Gly Phe Ser Ile Trp Trp Ser Trp Ile His
1 5 10

<210> 934
<211> 10
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> CDRH1 sintético

<400> 934

Gly Phe Trp Ile Trp Ser Ser Ser Ile His
1 5 10

<210> 935

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

<220>
<223> CDRH1 sintético

<400> 935

Gly Phe Trp Ile Trp Ser Ser Ser Ile His
1 5 10

<210> 936
<211> 10
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> CDRH1 sintético

<400> 936

Gly Phe Ser Ile Ser Ser Ser Trp Ile His
1 5 10

<210> 937
<211> 10
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> CDRH1 sintético

<400> 937

Gly Phe Ser Ile Ser Ser Ser Ser Ile His
1 5 10

<210> 938
<211> 10
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> CDRH1 sintético

<400> 938

Gly Phe Trp Ile Trp Ser Ser Ser Ile His
1 5 10

<210> 939
<211> 10
<212> PRT
<213> Artificial
<220>

<223> CDRH1 sintético

<400> 939

Gly Phe Ser Ile Trp Ser Ser Ser Ile His
1 5 10

<210> 940
<211> 10
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> CDRH1 sintético

<400> 940

Gly Phe Ser Ile Tyr Ser Tyr Tyr Ile His
1 5 10

<210> 941
<211> 10
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> CDRH1 sintético

<400> 941

Gly Phe Tyr Ile Ser Tyr Ser Tyr Ile His
1 5 10

<210> 942
<211> 10
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> CDRH1 sintético

<400> 942

Gly Phe Tyr Ile Ser Ser Ser Tyr Ile His
1 5 10

<210> 943
<211> 10
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> CDRH1 sintético

<400> 943

Gly Phe Ser Ile Ser Ser Ser Tyr Ile His
1 5 10

<210> 944
<211> 10
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> CDRH1 sintético

<400> 944

Gly Phe Ser Ile Ser Ser Ser Tyr Ile His
1 5 10

<210> 945
<211> 10
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> CDRH1 sintético

<400> 945

Gly Phe Ser Ile Tyr Ser Ser Tyr Ile His
1 5 10

<210> 946
<211> 10
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> CDRH1 sintético

<400> 946

Gly Phe Tyr Ile Ser Ser Ser Tyr Ile His
1 5 10

<210> 947
<211> 10
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> CDRH1 sintético

<400> 947

Gly Phe Tyr Ile Ser Tyr Ser Ser Ile His
1 5 10

<210> 948

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

<220>
<223> CDRH1 sintético

<400> 948

Gly Phe Tyr Ile Ser Ser Ser Ser Ile His
1 5 10

<210> 949
<211> 10
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> CDRH1 sintético

<400> 949

Gly Phe Ser Ile Tyr Tyr Ser Ser Ile His
1 5 10

<210> 950
<211> 10
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> CDRH1 sintético

<400> 950

Gly Phe Ser Ile Tyr Tyr Ser Ser Ile His
1 5 10

<210> 951
<211> 17
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> CDRH2 sintético

<400> 951

Ser Ile Ser Pro Ser Ser Gly Trp Thr Ser Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 952
<211> 17
<212> PRT

<213> Artificial

<220>
<223> CDRH2 sintético

<400> 952

Ser Ile Ser Pro Ser Ser Gly Trp Thr Ser Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 953
<211> 17
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> CDRH2 sintético

<400> 953

Ser Ile Tyr Pro Ser Ser Gly Tyr Thr Ser Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 954
<211> 17
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> CDRH2 sintético

<400> 954

Ser Ile Ser Pro Ser Ser Gly Trp Thr Ser Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 955
<211> 17
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> CDRH2 sintético

<400> 955

Ser Ile Ser Pro Ser Ser Gly Trp Thr Ser Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 956
<211> 17
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> CDRH2 sintético

<400> 956

Ser Ile Ser Pro Ser Ser Gly Trp Thr Ser Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 957
<211> 17
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> CDRH2 sintético

<400> 957

Ser Ile Trp Pro Ser Ser Gly Trp Thr Ser Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 958
<211> 17
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> CDRH2 sintético

<400> 958

Ser Ile Ser Pro Ser Ser Gly Trp Thr Ser Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 959
<211> 17
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> CDRH2 sintético

<400> 959

Ser Ile Ser Pro Ser Ser Gly Trp Thr Ser Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 960
<211> 17
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> CDRH2 sintético

<400> 960

Ser Ile Ser Pro Ser Ser Gly Trp Thr Ser Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 961
<211> 17
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> CDRH2 sintético

<400> 961

Trp Ile Ser Pro Ser Ser Gly Ser Thr Trp Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 962
<211> 17
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> CDRH2 sintético

<400> 962

Trp Ile Ser Pro Ser Ser Gly Ser Thr Trp Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 963
<211> 17
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> CDRH2 sintético

<400> 963

Trp Ile Trp Pro Ser Ser Gly Trp Thr Ser Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 964
<211> 17
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> CDRH2 sintético

<400> 964

Trp Ile Ser Pro Ser Trp Gly Ser Thr Trp Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 965
<211> 17
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> CDRH2 sintético

<400> 965

Trp Ile Ser Pro Ser Ser Gly Ser Thr Trp Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 966
<211> 17
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> CDRH2 sintético

<400> 966

Trp Ile Ser Pro Ser Ser Gly Ser Thr Trp Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 967
<211> 17
<212> PRT
<213> Artificial

<220>

<223> CDRH2 sintético

<400> 967

Ser Ile Tyr Pro Ser Ser Gly Tyr Thr Ser Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 968
<211> 17
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> CDRH2 sintético

<400> 968

Ser Ile Tyr Pro Tyr Ser Gly Tyr Thr Ser Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 969
<211> 17
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> CDRH2 sintético

<400> 969

Ser Ile Tyr Pro Tyr Ser Gly Tyr Thr Ser Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 970
<211> 17
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> CDRH2 sintético

<400> 970

Ser Ile Tyr Pro Tyr Ser Gly Tyr Thr Ser Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 971
<211> 17

<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> CDRH2 sintético

<400> 971

Ser Ile Tyr Pro Tyr Ser Gly Tyr Thr Ser Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 972
<211> 17
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> CDRH2 sintético

<400> 972

Ser Ile Tyr Pro Tyr Ser Gly Tyr Thr Ser Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 973
<211> 17
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> CDRH2 sintético

<400> 973

Ser Ile Tyr Pro Tyr Ser Gly Tyr Thr Ser Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 974
<211> 17
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> CDRH2 sintético

<400> 974

Ser Ile Ser Pro Tyr Ser Gly Tyr Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 975
<211> 17
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> CDRH2 sintético

<400> 975

Tyr Ile Ser Pro Ser Ser Gly Tyr Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 976
<211> 17
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> CDRH2 sintético

<400> 976

Ser Ile Tyr Pro Tyr Ser Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 977
<211> 17
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> CDRH2 sintético

<400> 977

Ser Ile Tyr Pro Ser Ser Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 978
<211> 8
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> CDRH3 sintético

<400> 978

Trp Trp Ser Ser Ala Ile Asp Tyr
1 5

<210> 979
<211> 8
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> CDRH3 sintético

<400> 979

Trp Trp Ser Ser Ala Leu Asp Tyr
1 5

<210> 980
<211> 8
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> CDRH3 sintético

<400> 980

Trp Trp Ser Ser Ala Leu Asp Tyr
1 5

<210> 981
<211> 8
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> CDRH3 sintético

<400> 981

Trp Trp Ser Ser Gly Met Asp Tyr
1 5

<210> 982
<211> 8
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> CDRH3 sintético

<400> 982

Trp Trp Ser Ser Ala Leu Asp Tyr
1 5

<210> 983

<211> 8
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> CDRH3 sintético

<400> 983

Trp Trp Ser Ser Ala Phe Asp Tyr
1 5

<210> 984
<211> 8
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> CDRH3 sintético

<400> 984

Trp Trp Ser Ser Ala Leu Asp Tyr
1 5

<210> 985
<211> 8
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> CDRH3 sintético

<400> 985

Trp Ser Ser Ser Ala Phe Asp Tyr
1 5

<210> 986
<211> 8
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> CDRH3 sintético

<400> 986

Trp Trp Ser Ser Ala Met Asp Tyr
1 5

<210> 987
<211> 8
<212> PRT
<213> Artificial
<220>

<223> CDRH3 sintético

<400> 987

Trp Ser Ser Trp Gly Leu Asp Tyr
1 5

<210> 988
<211> 12
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> CDRH3 sintético

<400> 988

Ser Ser Trp Ser Ser Trp Ser Ser Ala Leu Asp Tyr
1 5 10

<210> 989
<211> 12
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> CDRH3 sintético

<400> 989

Ser Ser Trp Ser Ser Trp Ser Ser Ala Leu Asp Tyr
1 5 10

<210> 990
<211> 12
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> CDRH3 sintético

<400> 990

Ser Ser Ser Ser Ser Trp Trp Ser Ala Ile Asp Tyr
1 5 10

<210> 991
<211> 12
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> CDRH3 sintético

<400> 991

Ser Ser Trp Ser Ser Trp Ser Trp Ala Leu Asp Tyr
1 5 10

<210> 992
<211> 12
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> CDRH3 sintético

<400> 992

Ser Ser Trp Ser Ser Trp Ser Ser Ala Met Asp Tyr
1 5 10

<210> 993
<211> 12
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> CDRH3 sintético

<400> 993

Ser Ser Trp Ser Ser Trp Ser Ser Ala Met Asp Tyr
1 5 10

<210> 994
<211> 8
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> CDRH3 sintético

<400> 994

Tyr Tyr Ser Tyr Ala Leu Asp Tyr
1 5

<210> 995
<211> 8
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> CDRH3 sintético

<400> 995

Tyr Tyr Ser Tyr Ala Phe Asp Tyr
1 5

<210> 996

<211> 8
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> CDRH3 sintético

<400> 996

Tyr Tyr Ser Tyr Ala Phe Asp Tyr
1 5

<210> 997
<211> 8
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> CDRH3 sintético

<400> 997

Tyr Tyr Ser Ser Ala Phe Asp Tyr
1 5

<210> 998
<211> 8
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> CDRH3 sintético

<400> 998

Tyr Tyr Ser Tyr Ala Leu Asp Tyr
1 5

<210> 999
<211> 8
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> CDRH3 sintético

<400> 999

Tyr Tyr Ser Tyr Ala Phe Asp Tyr
1 5

<210> 1000
<211> 8
<212> PRT
<213> Artificial
<220>

<223> CDRH3 sintético

<400> 1000

Tyr Tyr Ser Tyr Ala Leu Asp Tyr
1 5

<210> 1001
<211> 14
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> CDRH3 sintético

<400> 1001

Ser Ser Tyr Ser Tyr Tyr Tyr Tyr Ser Tyr Ala Leu Asp Tyr
1 5 10

<210> 1002
<211> 15
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> CDRH3 sintético

<400> 1002

Tyr Tyr Ser Ser Tyr Tyr Ser Tyr Tyr Ser Tyr Ala Leu Asp Tyr
1 5 10 15

<210> 1003
<211> 18
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> CDRH3 sintético

<400> 1003

Tyr Tyr Ser Ser Tyr Ser Ser Ser Ser Ser Tyr Tyr Tyr Tyr Ala Phe
1 5 10 15

Asp Tyr

<210> 1004
<211> 19
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> CDRH3 sintético
<400> 1004

Tyr Tyr Ser Ser Ser Ser Ser Tyr Ser Ser Ser Tyr Tyr Tyr Tyr Ala
1 5 10 15

Phe Asp Tyr

<210> 1005
<211> 48
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Oligonucleotídeos sintéticos

<400> 1005
gcagcttctg gcttctycat ttyctyctyc tycatacact gggtgcgt 48

<210> 1006
<211> 60
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Oligonucleotídeos sintéticos

<400> 1006
ctggaatggg ttgcatycat ttycccatyc tycggttyca cttyctatgc cgatagcgtc 60

<210> 1007
<211> 54
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Oligonucleotídeos sintéticos

<400> 1007
acttattact gtcagcaaty ctyctyctyc ccatycacgt tcggacaggg tacc 54

<210> 1008
<211> 48
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Oligonucleotídeos sintéticos

<400> 1008
gcagcttctg gcttcmgcat tmgcmgcmgc mgcatacact gggtgcgt 48

<210> 1009
<211> 60
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Oligonucleotídeos sintéticos

<400> 1009
ctggaatggg ttgcamgcat tmgcccamgc mgcggtmgca ctmgctatgc cgatagcgtc 60

<210> 1010
<211> 54
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Oligonucleotídeos sintéticos

<400> 1010
acttattact gtcagcaamg cmgcmgcmgc ccamgcacgt tcggacaggg tacc 54

<210> 1011
<211> 48
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Oligonucleotídeos sintéticos

<400> 1011
gcagcttctg gcttctsgat ttsgtsgtsg tsgatacact gggtgcgt 48

<210> 1012
<211> 60
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Oligonucleotídeos sintéticos

<400> 1012
ctggaatggg ttgcatsgat ttsgccatsg tsgggttsga cttsgtatgc cgatagcgtc 60

<210> 1013
<211> 54
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Oligonucleotídeos sintéticos

<400> 1013
acttattact gtcagcaats gtsgtsgtsg ccatsgacgt tcggacaggg tacc 54

REIVINDICAÇÕES

1 POLIPEPTÍDEO, que compreende um domínio variável da cadeia pesada de imunoglobina no qual:

(i) CDRH1 compreende uma seqüência de aminoácidos: G-F-X1-I-X2-X3-X4-X5-I-H (SEQ ID No: 22), no qual G é a posição 26 e X1 é a posição 28 de acordo com o sistema de numeração de Kabat; no qual, X1 é selecionado de S e Y; no qual, X2 é selecionado de Y e S; no qual, X3 é selecionado de Y e S; no qual, X4 é selecionado de Y e S; no qual, X5 é selecionado de Y e S;

(ii) CDRH2 compreende uma seqüência de aminoácidos: X1-I-X2-P-X3-X4-G-X5-T-X6-Y-A-D-S-V-K-G (SEQ ID No: 23), no qual X1 é a posição 50, de acordo com o sistema de numeração de Kabat; no qual, X1 é selecionado de Y e S; no qual X2 é selecionado de Y e S; no qual, X3 é selecionado de Y e S; no qual, X4 é selecionado de Y e S; no qual, X5 é selecionado de Y e S, e no qual X6 selecionado de Y e S; e

(iii) CDRH3 compreende uma seqüência de aminoácidos: X1-X2-X3-X4-X5-x6-X7-X8-X9-X10-X11-X12-X13-X.14-X15-X16-D-Y (SEQ ID No ED: 31), no qual, X1 é a posição 95 de acordo com o sistema de numeração de Kabat, e no qual X1 é selecionado de R, Y, M; X2 é selecionado de Y e R; X3 é selecionado de Y, S, R, P e G, X4 é selecionado de Y e S; X5 é selecionado de Y, S, R e H; X6 é selecionado de R, Y e S; X7 é selecionado de G, Y e S; X8 é selecionado de R, Y e S; X9 é selecionado de G, Y e S; X10 é selecionado de R, Y e S; X11 é selecionado de G, Y e S; X12 é selecionado de S, Y, R, G e A; X13 é selecionado de G e Y; X14 é selecionado de L, M, R, G e A; e X15 é selecionado de G, F e L ou não está presente, e X16 é F ou não está presente.

2 POLIPEPTÍDEO, que compreende um domínio variável da cadeia pesada de imunoglobulina, no qual:

(i) CDRH1 compreende uma seqüência de aminoácidos: G-F-X1-

I-X2-X3-X4-X5-I-H (SEQ ID No: 22), no qual G é a posição 26 e X1 é a posição 28 de acordo com o sistema de numeração de Kabat; no qual X1 é selecionado de Y e S; no qual X2 é selecionado de Y e S; no qual, X3 é selecionado de Y e S; no qual, X4 é selecionado de Y e S; no qual, X5 é selecionado de Y e S;

(ii) CDRH2 compreende uma seqüência de aminoácidos: X1-I-X2-P-X3-X4-G-X5-T-X6-Y-A-D-S-V-K-G (SEQ ID No: 23), no qual X1 é a posição 50, de acordo com o sistema de numeração de Kabat; no qual, X1 é selecionado de Y e S; no qual X2 é selecionado de Y e S; no qual, X3 é selecionado de Y e S; no qual, X4 é selecionado de Y e S; no qual, X5 é selecionado de Y e S, e no qual X6 selecionado de Y e S; e

(iii) CDRH3 compreende uma seqüência de aminoácidos: X1-X2-X3-X4-X5-x6-X7-X8-X9-X10-X11-X12-X13-X14-X15-X16-X17-X18-X19-D-Y (SEQ ID No ED: 24), no qual, X1 é a posição 95 de acordo com o sistema de numeração de Kabat, caracterizada pelo fato dos aminoácidos em cada uma das posições de X1-X6 serem selecionados a partir de um *pool* de aminoácidos numa razão molar de 50% de Y, 25% de S, e 25% de G; caracterizada pelo fato dos aminoácidos em cada uma das posições de X7-X17 serem selecionados a partir de um *pool* de aminoácidos numa razão molar de 50% de Y, 25% de S e 25% de G, ou não estarem presentes; no qual X18 é selecionado de G e A, e no qual X19 é selecionado de I, M, L e F.

3 POLIPEPTÍDEO, que compreende um domínio variável da cadeia pesada de imunoglobulina, no qual:

(i) CDRH1 compreende uma seqüência de aminoácidos: G-F-X1-I-X2-X3-X4-X5-I-H (SEQ ID No: 22), no qual G é a posição 28 e X1 é a posição 28 de acordo com o sistema de numeração de Kabat; no qual X1 é selecionado de Y e S; no qual X2 é selecionado de Y e S; no qual, X3 é selecionado de Y e S; no qual, X4 é selecionado de Y e S; no qual, X5 é selecionado de Y e S;

(ii) CDRH2 compreende uma seqüência de aminoácidos: X1-I-X2-

P-X3-X4-G-X5-T-X6-Y-A-D-S-V-K-G (SEQ ID No: 23), no qual, X1 é a posição 50, de acordo com o sistema de numeração de Kabat; no qual, X1 é selecionado de Y e S; no qual, X2 é selecionado de Y e S; no qual, X3 é selecionado de Y e S; no qual, X4 é selecionado de Y e S; no qual, X5 é selecionado de Y e S, e no qual, X6 selecionado de Y e S; e

(iii) CDRH3 compreende uma seqüência de aminoácidos: X1-X2-X3-X4-X5-X6-X7-X8-X9-X10-X11-X12-X13-X14-X15-X16-X17-X18-X19-D-Y (SEQ ID No ED: 26), no qual, X1 é a posição 95 de acordo com o sistema de numeração de Kabat, caracterizada pelo fato dos aminoácidos em cada uma das posições de X1-X6 serem selecionados a partir de um *pool* de aminoácidos numa razão molar de 25% de Y, 50% de S, e 25% de R; caracterizada pelo fato dos aminoácidos em cada uma das posições de X7-X17 serem selecionados a partir de um *pool* de aminoácidos numa razão molar de 25% de Y, 50% de S e 25% de R, ou não estarem presentes; no qual, X18 é selecionado de G e A; e no qual, X19 é selecionado de I, M, L e F.

4 POLIPEPTÍDEO, que compreende um domínio variável da cadeia pesada de imunoglobulina, no qual:

(i) CDRH1 compreende uma seqüência de aminoácidos: G-F-X1-I-X2-X3-X4-X5-I-H (SEQ ID No: 22), no qual G é a posição 26 e X1 é a posição 28 de acordo com o sistema de numeração de Kabat; no qual X1 é selecionado de Y e S; no qual X2 é selecionado de Y e S; no qual, X3 é selecionado de Y e S; no qual, X4 é selecionado de Y e S; no qual, X5 é selecionado de Y e S;

(ii) CDRH2 compreende uma seqüência de aminoácidos: X1-I-X2-P-X3-X4-G-X5-T-X6-Y-A-D-S-V-K-G (SEQ ID No: 23), no qual, X1 é a posição 50, de acordo com o sistema de numeração de Kabat; no qual, X1 é selecionado de Y e S; no qual, X2 é selecionado de Y e S; no qual, X3 é selecionado de Y e S; no qual, X4 é selecionado de Y e S; no qual, X5 é selecionado de Y e S, e no qual, X6 selecionado de Y e S; e

(iii) CDRH3 compreende uma seqüência de aminoácidos: X1-X2-X3-X4-X5-X6-X7-X8-X9-X10-X11-X12-X13-X14-X15-X16-X17-X18-X19-D-Y (SEQ ID No ED: 27), no qual, X1 é a posição 95 de acordo com o sistema de numeração de Kabat, caracterizada pelo fato dos aminoácidos em cada uma das posições de X1-X6 serem selecionados a partir de um *pool* de aminoácidos numa razão molar de 38% de Y, 25% de S, e 25% de G e 12% de R; caracterizada pelo fato dos aminoácidos em cada uma das posições de X7-X17 serem selecionados a partir de um *pool* de aminoácidos numa razão molar de 38% de Y, 25% de S, e 25% de G e 12% de R, ou não estarem presentes; no qual, X18 é selecionado de G e A, e no qual, X19 é selecionado de I, M, L e F.

5 POLIPEPTÍDEO, que compreende um domínio variável da cadeia pesada de imunoglobulina, no qual:

(i) CDRH1 compreende uma seqüência de aminoácidos: G-F-X1-I-X2-X3-X4-X5-I-H (SEQ ID No: 22), no qual, G é a posição 26 e X1 é a posição 28 de acordo com o sistema de numeração de Kabat; no qual, X1 é selecionado de Y e S; no qual, X2 é selecionado de Y e S; no qual, X3 é selecionado de Y e S; no qual, X4 é selecionado de Y e S; no qual, X5 é selecionado de Y e S;

(ii) CDRH2 compreende uma seqüência de aminoácidos: X1-I-X2-P-X3-X4-G-X5-T-X6-Y-A-D-S-V-K-G (SEQ ID No: 23), no qual, X1 é a posição 50, de acordo com o sistema de numeração de Kabat; no qual, X1 é selecionado de Y e S; no qual, X2 é selecionado de Y e S; no qual, X3 é selecionado de Y e S; no qual, X4 é selecionado de Y e S; no qual, X5 é selecionado de Y e S, e no qual, X6 selecionado de Y e S; e

(iii) CDRH3 compreende uma seqüência de aminoácidos: X1-X2-X3-X4-X5-X6-X7-X8-X9-X10-X11-X12-X13-X14-X15-X16-X17-X18-X19-D-Y (SEQ ID No ED: 28), no qual, X1 é a posição 95 de acordo com o sistema de numeração de Kabat, caracterizada pelo fato dos aminoácidos em cada uma

das posições de X1-X6 serem selecionados a partir de um *pool* de aminoácidos numa razão molar de 20% de Y, 26% de S, 26% de G, 13% de R, 1% de A, 1% de D, 1% de E, 1% de F, 1% de H, 1% de I, 1% de K, 1% de L, 1% de M, 1% de N, 1% de P, 1% de Q, 1% de T, 1% de V e 1% de W; caracterizada pelo fato dos aminoácidos em cada uma das posições de X7-X17 serem selecionados a partir de um *pool* de aminoácidos numa razão molar de 20% de Y, 26% de S, 26% de G, 13% de R, 1% de A, 1% de D, 1% de E, 1% de F, 1% de H, 1% de I, 1% de K, 1% de L, 1% de M, 1% de N, 1% de P, 1% de Q, 1% de T, 1% de V e 1% de W, ou não estão presentes; no qual, X18 é selecionado de G e A, e no qual, X19 é selecionado de I, M, L e F.

6 POLIPEPTÍDEO, de acordo com uma das reivindicações de 1 a 5, caracterizado pelo fato do CDRH1 compreender uma seqüência de aminoácidos selecionada de qualquer uma das SEQs ID Nos: 524-540 e 189-294.

7 POLIPEPTÍDEO, de acordo com uma das reivindicações de 1 a 5, caracterizado pelo fato do CDRH2 compreender uma seqüência de aminoácidos selecionada de qualquer uma das SEQs ID Nos: 541-557 e 295-400.

8 POLIPEPTÍDEO, de acordo com uma das reivindicações de 1 a 5, caracterizado pelo fato do CDRH3 compreender uma seqüência de aminoácidos selecionada de qualquer uma das SEQs ID Nos: 558-574 e 401-506.

9 POLIPEPTÍDEO, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato da posição do aminoácido X1 no CDRH3 é a posição 95 e é este é selecionado de R e Y; X3 é a posição 97 e é S; X8 é a posição do aminoácido 100b e é S; X9 é a posição do aminoácido 100c e é Y; X10 e é a posição do aminoácido 100d e é Y ou R.

10 POLIPEPTÍDEO, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato da posição do CRDH3 possuir a seqüência de aminoácido X1-R-S-Y-R-Y-G-S-Y-X10-G-S-Y-X14-F-D-Y (SEQ ID No.: 575).

11 POLIPEPTÍDEO, de acordo com uma das reivindicações

de 1 a 10, caracterizado pelo fato do polipeptídeo se ligar ao DR5 humano.

12 POLIPEPTÍDEO de acordo com a reivindicação 11, caracterizado pelo fato de que o polipeptídeo é um anticorpo.

13 POLIPEPTÍDEO de acordo com a reivindicação 12, caracterizado pelo fato de que o domínio variável da cadeia pesada compreende:

i) um CDRH1 contendo uma seqüência de aminoácidos GFYISSSSIH (SEQ ID No: 576);

ii) um CDRH2 contendo uma seqüência de aminoácidos SISPSSGSTYYADSVKG (SEQ NO ID: 577); e

iii) um CDRH3 contendo uma seqüência de aminoácidos YRSYRYGSYYGSYGFDY (SEQ NO ID: 578).

14 POLIPEPTÍDEO, de acordo com a reivindicação 12, caracterizado pelo fato de que o domínio pesado da cadeia variável compreende:

i) um CDRH1 contendo uma seqüência de aminoácidos GFYISSSSIH (SEQ ID No: 579);

ii) um CDRH2 contendo uma seqüência de aminoácidos SISPSSGYTSYADSVKG (SEQ NO ID: 580); e

iii) um CDRH3 contendo uma seqüência de aminoácidos RRSYRYGSYRGSYAFDY (SEQ NO ID: 581).

15 POLIPEPTÍDEO, de acordo com uma das reivindicações de 1 a 14, caracterizado pelo fato do polipeptídeo se ligar ao DR5 humano e murino.

16 POLIPEPTÍDEO, de acordo com uma das reivindicações de 1 a 15 que consta adicionalmente de um domínio variável da cadeia leve, no qual:

(i) CDRL3 compreende uma seqüência de aminoácidos Q-Q-X1-X2-X3-X4-P-X5-T (ID SEQ NO: 25); no qual, X1 é a posição 91 e é selecionado de Y, H e S; X2 é selecionado de Y e S; X3 é selecionado de Y, S

e T; X4 é selecionado de Y, S e T, e X5 é selecionado de S, P e Y.

17 POLIPEPTÍDEO, de acordo com a reivindicação 16, caracterizado pelo fato de que compreende adicionalmente um CDRL1 que possuir a seqüência de aminoácidos RASQDVNTAVA (ID SEQ NO: 29).

18 POLIPEPTÍDEO, de acordo com a reivindicação 16, caracterizado pelo fato de que compreende adicionalmente um CDRL2 que possuir a seqüência de aminoácidos SASSLYS (ID SEQ NO: 30).

19 POLIPEPTÍDEO, que compreende um domínio variável da cadeia pesada de imunoglobulina, no qual:

(i) CDRH1 compreende uma seqüência de aminoácidos: G-F-X1-I-X2-X3-X4-X5-I-H (SEQ ID No: 22), no qual, X1 é a posição 28 de acordo com o sistema de numeração de Kabat e é selecionado de S e Y; X2 é selecionado de S e Y; X3 é selecionado de S e Y; X4 é selecionado de S e Y; X5 é selecionado de S e Y;

(ii) CDRH2 compreende uma seqüência de aminoácidos: X1-I-X2-P-X3-X4-G-X5-T-X6-Y-A-D-S-V-K-G (SEQ ID No: 23), no qual, X1 é a posição 50, de acordo com o sistema de numeração de Kabat e é selecionado de S e Y; X2 é selecionado de S e Y; X3 é selecionado de S e Y; X4 é selecionado de S e Y; X5 é selecionado de S e Y, e X6 selecionado de S e Y; e

(iii) CDRH3 compreende uma seqüência de aminoácidos: X1-X2-X3-X4-X5-X6-X7- D-Y (SEQ ID No: 582), no qual, X1 é a posição do aminoácido 95 de acordo com o sistema de numeração de Kabat e é selecionado de S e Y; X2 é selecionado de S e Y e R; X3 é selecionado de S, G, Y e H; X4 é selecionado de S, G, Y e R; X5 é selecionado de G e A; X6 é selecionado de F, M, L e A; e X7 é selecionado de F, M e L ou está ausente.

20 POLIPEPTÍDEO, de acordo com a reivindicação 19, caracterizado pelo fato do CDRH1 compreender uma seqüência de aminoácidos selecionada das SEQ ID Nos: 189-198.

21 POLIPEPTÍDEO, de acordo com a reivindicação 19, caracterizado pelo fato do CDRH2 compreender uma seqüência de aminoácidos selecionada das SEQ ID Nos: 295-304.

22 POLIPEPTÍDEO, de acordo com a reivindicação 19, caracterizado pelo fato do CDRH3 compreender uma seqüência de aminoácidos selecionada das SEQ ID Nos: 401-410.

23 POLIPEPTÍDEO, que compreende um domínio variável da cadeia pesada de imunoglobulina, no qual:

(i) CDRH1 compreende uma seqüência de aminoácidos: G-F-X1-I-X2-X3-X4-X5-I-H (SEQ ID No: 22), no qual, X1 é a posição 28 de acordo com o sistema de numeração de Kabat e é selecionado de S e Y; X2 é selecionado de S e Y; X3 é selecionado de S e Y; X4 é selecionado de S e Y; X5 é selecionado de S e Y;

(ii) CDRH2 compreende uma seqüência de aminoácidos: X1-I-X2-P-X3-X4-G-X5-T-X6-Y-A-D-S-V-K-G (SEQ ID No: 22), no qual, X1 é a posição 50, de acordo com o sistema de numeração de Kabat e é selecionado de S e Y; X2 é selecionado de S e Y; X3 é selecionado de S e Y; X4 é selecionado de S e Y; X5 é selecionado de S e Y, e

(iii) CDRH3 compreende uma seqüência de aminoácidos: X1-X2-X3-X4-X5-X6-X7-X8-D-Y (SEQ ID No: 583), no qual, X1 é a posição do aminoácido 95 de acordo com o sistema de numeração de Kabat e é selecionado de Y, S e G; X2 é selecionado de Y, S, G, R e A; X3 é selecionado de G, Y, S e R; X4 é selecionado de G, Y e F; X5 é selecionado de Y, S, N e G; X6 é selecionado de Y, R, H e W; e X7 é selecionado de G e A; e X8 é selecionado de F, M, L e I.

24 POLIPEPTÍDEO, de acordo com a reivindicação 23, caracterizado pelo fato do CDRH1 compreender uma seqüência de aminoácidos selecionada das SEQ ID Nos: 199-216.

25 POLIPEPTÍDEO, de acordo com a reivindicação 23, caracterizado pelo fato do CDRH2 compreender uma seqüência de aminoácidos selecionada das SEQ ID Nos: 305-322.

26 POLIPEPTÍDEO, de acordo com a reivindicação 23, caracterizado pelo fato do CDRH3 compreender uma seqüência de aminoácidos selecionada das SEQ ID Nos: 411-428.

27 POLIPEPTÍDEO, que compreende um domínio variável da cadeia pesada de imunoglobulina, no qual:

(i) CDRH1 compreende uma seqüência de aminoácidos: G-F-X1-I-X2-X3-X4-X5-I-H (SEQ ID No: 22), no qual, X1 é a posição 28 de acordo com o sistema de numeração de Kabat e é selecionado de S e Y; X2 é selecionado de S e Y; X3 é selecionado de S e Y; X4 é selecionado de S e Y; X5 é selecionado de S e Y;

(ii) CDRH2 compreende uma seqüência de aminoácidos: X1-I-X2-P-X3-X4-G-X5-T-X6-Y-A-D-S-V-K-G (SEQ ID No: 23), no qual, X1 é a posição 50, de acordo com o sistema de numeração de Kabat e é selecionado de S e Y; X2 é selecionado de S e Y; X3 é selecionado de S e Y; X4 é selecionado de S e Y; X5 é selecionado de S e Y, e

(iii) CDRH3 compreende uma seqüência de aminoácidos: X1-X2-X3-X4-X5-X6-X7-X8-X9-X10-X11-X12-X13-X14-X15-X16-X17-X18-X19-D-Y (SEQ ID No: 584), no qual, X1 é a posição do aminoácido 95 é selecionado de Y, S, R e G; X2 é selecionado de Y, S, R e G; X3 é selecionado de S, Y, G e W; X4 é selecionado de S, Y, G e Q; X5 é selecionado de G, Y e S; X6 é selecionado de G, Y S, R e V; X7 é selecionado de S, Y, G e R; X8 é selecionado de Y, S, G, R, P e V; X9 é selecionado de G, A,Y,S e R; X10 é selecionado de M, F, G, Y, S e R; X11 é selecionado de A, Y, S, G e R; X12 é selecionado de I, M, F, L, A, G, S, Y, R e T; X13 é selecionado de F, M, L, G, A,Y, T E S ou não está presente; X14 é selecionado de L, M, F, I, G, Y, A e T;

e X15 é selecionado de M, L, Y, G e R ou não está presente; X16 é selecionado de Y e G ou não está presente; X17 é selecionado de R, M e G ou não está presente; X18 é selecionado de P e A ou não está presente; e X18 é L ou não está presente.

28 POLIPEPTÍDEO, que compreende um domínio variável da cadeia pesada de imunoglobulina, no qual:

(i) CDRH1 compreende uma seqüência de aminoácidos: G-F-X1-I-X2-X3-X4-X5-I-H (SEQ ID No: 22), caracterizado pelo fato de que G é a posição 26 e X1 é a posição 28 de acordo com o sistema de numeração de Kabat; e no qual X1-X5 são aminoácidos naturalmente presentes que não a cisteína;

(ii) CDRH2 compreende uma seqüência de aminoácidos: X6-I-X7-P-X8-X9-G-X10-T-X11-Y-A-D-S-V-K-G, no qual, X6 é a posição 50 de acordo com o sistema de numeração de Kabat, e no qual, X6-X11 são aminoácidos naturalmente presentes que não a cisteína; e

(iii) CDRH3 compreende uma seqüência de aminoácidos: X12-X13-X14-X15-X16-$(X17)_n$-X18-X19-D-Y, no qual X12 é a posição 95 de acordo com o sistema de numeração de Kabat; e no qual, n é um número adequado que manterá a atividade funcional do domínio variável da cadeia pesada; e no qual, X12-X19 são aminoácidos naturalmente presentes que não a cisteína.

29 POLIPEPTÍDEO, de acordo com a reivindicação 28, caracterizado pelo fato de que n é um número de 1 a 12.

30 POLIPEPTÍDEO, de acordo com a reivindicação 28, caracterizado pelo fato de que X1 é selecionado de Y e S; X2 é selecionado de Y e S; X3 é selecionado de Y e S; X4 é selecionado de Y e S; X5 é selecionado de Y e S; e X6 é selecionado de Y e S.

31 POLIPEPTÍDEO, de acordo com a reivindicação 28, caracterizado pelo fato de que X6 é selecionado de Y e S; X7 é selecionado de Y e S; X8 é selecionado de Y e S; X9 é selecionado de Y e S; X10 é

selecionado de Y e S; e X11 é selecionado de Y e S.

32 POLIPEPTÍDEO, de acordo com a reivindicação 28, caracterizado pelo fato de que os aminoácidos em cada uma das posições X12-X17 são selecionados a partir de um *pool* de aminoácidos numa razão molar de 50% de Y, 25% de S e 25% de G, e X18 é selecionado de G e A, e X19 é selecionado de I, M, L, e F.

33 POLIPEPTÍDEO, de acordo com a reivindicação 28, caracterizado pelo fato de que os aminoácidos em cada uma das posições X12-X17 são selecionados a partir de um *pool* de aminoácidos numa razão molar de 25% de Y, 50% de S e 25% de R, no qual X18 é selecionado de G e A, e X19 é selecionado de I, M, L, e F.

34 POLIPEPTÍDEO, de acordo com a reivindicação 28, caracterizado pelo fato de que os aminoácidos em cada uma das posições X12-X17 são selecionados a partir de um *pool* de aminoácidos numa razão molar de 38% de Y, 25% de S, 25% de G e 12% de R, no qual X18 é selecionado de G e A, e X19 é selecionado de I, M, L, e F.

35 POLIPEPTÍDEO, de acordo com a reivindicação 28, caracterizado pelo fato de que os aminoácidos em cada uma das posições X12-X17 são selecionados a partir de um *pool* de aminoácidos numa razão molar de 20% Y, 26% S, 26% G, 13% R, 1% A, 1% D, 1% E, 1% F, 1% H, 1% I, 1% K, 1% L, 1% M, 1% N, 1% P, 1% Q, 1% T, 1% V, e de 1% W; no qual, X18 é selecionada de G e A; e X19 é selecionado de I, M, L, e F.

36 POLIPEPTÍDEO, de acordo com uma das reivindicações de 27-35, caracterizado pelo fato do CDRH1 compreender uma seqüência de aminoácidos selecionada de qualquer uma das SEQ ID Nos: 217-294.

37 POLIPEPTÍDEO, de acordo com uma das reivindicações de 27-35, caracterizado pelo fato do CDRH2 compreender uma seqüência de aminoácidos selecionada de qualquer uma das SEQ ID Nos: 323-400.

38 POLIPEPTÍDEO, de acordo com uma das reivindicações de 27-35, caracterizado pelo fato do CDRH3 compreender uma seqüência de aminoácidos selecionada de qualquer uma das SEQ ID Nos: 429-506.

39 POLIPEPTÍDEO, que compreende um domínio variável da cadeia pesada de imunoglobulina, no qual:

(i) CDRH1 compreende uma seqüência de aminoácidos: G-F-X1-I-X2-X3-X4-X5-I-H, caracterizado pelo fato de que G é a posição 26 e X1 é a posição 28 de acordo com o sistema de numeração de Kabat; no qual, X1 é selecionado de Y e S; no qual, X2 é selecionado de Y e S; no qual, X3 é selecionado de Y e S; no qual, X4 é selecionado de Y e S; no qual, X5 é selecionado de Y e S;

(ii) CDRH2 compreende uma seqüência de aminoácidos: X1-I-X2-P-X3-X4-G-X5-T-X6-Y-A-D-S-V-K-G, caracterizado pelo fato de que X1 é a posição 50 de acordo com o sistema de numeração de Kabat ; no qual, X1 é selecionado de Y e S; no qual, X2 é selecionado de Y e S; no qual, X3 é selecionado de Y e S; no qual, X4 é selecionado de Y e S; no qual, X5 é selecionado de Y e S; e no qual, X6 selecionado de Y e S; e

(iii) CDRH3 compreende uma seqüência de aminoácidos: X1-X2-X3-X4-X5-X6-X7-X8-X9-X10-X11-X12-X13-X14-X15-X16-X17-X18-X19, caracterizado pelo fato de que X1 é a posição 95 de acordo com o sistema de numeração de Kabat, e no qual os aminoácidos em cada uma das posições de X1-X17 são selecionadas de A, C, F, G, I, L, N, P, R, T, W ou Y, ou não estão presentes; X18 é selecionado de G e A; e X19 é selecionado de F, L, I, e M.

40 POLIPEPTÍDEO, de acordo com a reivindicação 39, caracterizado pelo fato do CDRH1 compreender uma seqüência de aminoácidos selecionada das SEQ ID Nos: 816-842.

41 POLIPEPTÍDEO, de acordo com a reivindicação 39, caracterizado pelo fato do CDRH2 compreender uma seqüência de

aminoácidos selecionada das SEQ ID Nos: 843-869.

42 POLIPEPTÍDEO, de acordo com a reivindicação 39, caracterizado pelo fato do CDRH3 compreender uma seqüência de aminoácidos selecionada das SEQ ID Nos: 870-896.

43 POLIPEPTÍDEO, que compreende um domínio variável da cadeia pesada de imunoglobulina, no qual:

(i) CDRH1 compreende uma seqüência de aminoácidos: G-F-X1-I-X2-X3-X4-X5-I-H, caracterizado pelo fato de que G é a posição 26 e X1 é a posição 28 de acordo com o sistema de numeração de Kabat; e no qual os aminoácidos em cada uma das posições de X1-X5 são selecionadas de S e um dentre F, L, I e M; e

(ii) CDRH2 compreende uma seqüência de aminoácidos: X1-I-X2-P-X3-X4-G-X5-T-X6-Y-A-D-S-V-K-G, caracterizado pelo fato de que X1 é a posição 50 de acordo com o sistema de numeração de Kabat ; e no qual os aminoácidos em cada uma das posições de X1-X6 são selecionadas de S e um dentre F, L, I e M; e

(iii) CDRH3 compreende uma seqüência de aminoácidos: X1-X2-X3-X4-X5-X6-X7-X8-X9-X10-X11-X12-X13-X14-X15-X16-X17-X18-X19, caracterizado pelo fato de que X1 é a posição 95 de acordo com o sistema de numeração de Kabat, e os aminoácidos em cada uma das posições de X1-X19 são selecionadas a partir S e um dentre Y, W, R ou F, ou não esta presente; X18 é selecionado a partir de G e A; e X19 é selecionado de F, L, I, e M.

44 POLIPEPTÍDEO, de acordo com a reivindicação 43, caracterizado pelo fato do CDRH1 compreender uma seqüência de aminoácidos selecionada das SEQ ID Nos: 924-950.

45 POLIPEPTÍDEO, de acordo com a reivindicação 43, caracterizado pelo fato do CDRH2 compreender uma seqüência de aminoácidos selecionada das SEQ ID Nos: 951-977.

46 POLIPEPTÍDEO, de acordo com a reivindicação 43, caracterizado pelo fato do CDRH3 compreender uma seqüência de aminoácidos selecionada das SEQ ID Nos: 978-1004.

47 POLIPEPTÍDEO, de acordo com uma das reivindicações de 2 a 8 ou 16 a 46, caracterizado pelo fato do polipeptídeo se ligar ao HER-2 humano.

48 POLIPEPTÍDEO, de acordo com a reivindicação 47, caracterizado pelo fato de que o polipeptídeo é um anticorpo.

49 POLIPEPTÍDEO, de acordo com a reivindicação 39 ou 40, caracterizado pelo fato de que o domínio variável da cadeia pesada compreende:

i) um CDRH1 contendo uma seqüência de aminoácidos GFSIYSSYIH (SEQ ID No: 821);

ii) um CDRH2 contendo uma seqüência de aminoácidos SIYPYSGYTSYADSVKG (SEQ ID No: 848); e

iii) um CDRH3 contendo uma seqüência de aminoácidos WWSSAFDY (SEQ ID No: 875).

50 POLIPEPTÍDEO, de acordo com a reivindicação 39 ou 40, caracterizado pelo fato de que o domínio variável da cadeia pesada compreende:

i) um CDRH1 contendo uma seqüência de aminoácidos GFSIWWSWIH (SEQ ID NO: 932);

ii) um CDRH2 contendo uma seqüência de aminoácidos SISPSSGWTSYADSVKG (SEQ ID No: 959); e

iii) um CDRH3 contendo uma seqüência de aminoácidos WWSSAMDY (SEQ ID No: 986).

51 POLIPEPTÍDEO, de acordo com a reivindicação 39 ou 40, caracterizado pelo fato de que o domínio variável da cadeia pesada compreende:

i) um CDRH1 contendo uma seqüência de aminoácidos GFSISSSYIH (SEQ ID No: 944);

ii) um CDRH2 contendo uma seqüência de aminoácidos SIYPYSGYTSYADSVKG (SEQ ID No: 971); e

iii) um CDRH3 contendo uma seqüência de aminoácidos YYSYALDY (SEQ ID No: 998).

52 POLIPEPTÍDEO, de acordo com a reivindicação 39 ou 40, caracterizado pelo fato de que o domínio variável da cadeia pesada compreende:

i) um CDRH1 contendo uma seqüência de aminoácidos GFYISSSSIH (SEQ ID No: 230);

ii) um CDRH2 contendo uma seqüência de aminoácidos YIYPSSGYTSYADSVKG (SEQ ID No: 336); e

iii) um CDRH3 contendo uma seqüência de aminoácidos GYYYSYYSGYALDY (SEQ ID No: 442).

53 POLIPEPTÍDEO, de acordo com uma das reivindicações de 19-52, que consta adicionalmente de um domínio variável da cadeia leve, no qual:

(i) CDRL3 compreende uma seqüência de aminoácidos Q-Q-X_1-X_2-X_3-X_4-P-X_5-T (ID SEQ NO: 25); caracterizado pelo fado de que X_1 é a posição 91 de acordo com o sistema de numeração de Kabat e é selecionado de S e Y; X_2 é selecionado de S, Y e F; X_3 é selecionado de Y; X_4 é selecionado de Y e S, e X_5 é selecionado de S e Y.

54 POLIPEPTÍDEO, que compreende um domínio variável da cadeia leve possuindo uma seqüência CDRL3 onde o CDRL3 possuí a seqüência de aminoácidos Q-Q-X1-X2-X3-X4-P-X5-T (SEQ ID No: 25), em que X1 é a posição 91 de acordo com a numeração de Kabat e é selecionado de S e Y; X2 é selecionado de S, Y e F; X3 é selecionado de Y, S, F; X4 é selecionado de Y e S; X5 é selecionado de S e Y.

55 POLIPEPTÍDEO, que compreende um domínio variável da cadeia leve de imunoglobulina, onde o CDRL3 compreende uma seqüência de aminoácidos Q-Q-X1-X2-X3-X4-P-X5-T; no qual, X1 é a posição 91 de acordo com o sistema de numeração de Kabat e os aminoácidos em cada uma das posições de X1-X5 são selecionadas de S e um dentre Y, W, R ou F.

56 POLIPEPTÍDEO, que compreende um domínio variável da cadeia leve de imunoglobulina, no qual:

(i) CDRL1 compreende uma primeira seqüência consenso hipervariável ou variante desta contendo uma substituição em uma ou mais posições, em comparação com a seqüência consenso hipervariável correspondente;

(ii) CDRL2 compreende uma segunda seqüência consenso hipervariável ou variante desta contendo uma substituição em uma ou mais posições, em comparação com a seqüência consenso hipervariável correspondente, e

(iii) CDRL3 compreende uma seqüência de aminoácidos: Q-Q-X1-X2-X3-$(X4)_n$-X5-X6-T, caracterizado pelo fato de que X1 é a posição 91 de acordo com o sistema de numeração de Kabat.

57 POLIPEPTÍDEO, de acordo com a reivindicação 56, caracterizado pelo fato de que X1 é a posição 91 de acordo com o sistema de numeração de Kabat e X1 é selecionado de Y e S; X2 é selecionado de Y e S; X3 é selecionado de Y e S; X4 é selecionado de Y e S; X5 é selecionado de P e L; e X6 é selecionado de F, L, I e V.

58 POLIPEPTÍDEO de acordo com a reivindicação 56, caracterizado pelo fato de que n é um número de 1 a 3.

59 POLIPEPTÍDEO, de acordo com uma das reivindicações de 54 a 58, caracterizado pelo fato do CDRL3 compreender uma seqüência de aminoácidos selecionada das SEQ ID Nos: 83-188, 789-815 e 897-923.

60 POLIPEPTÍDEO, de acordo com uma das reivindicações de 54 a 58, caracterizado pelo fato de incluir adicionalmente um CDRL1 que compreende uma seqüência de aminoácidos RASQDVNTAVA (ID SEQ NO: 29).

61 POLIPEPTÍDEO, de acordo com uma das reivindicações 54 a 58 e reivindicações 55 ou 56, caracterizado pelo fato de incluir adicionalmente um CDRL2 que compreende uma seqüência de aminoácidos SASSLYS (SEQ ID No: 30).

62 ANTICORPO, que compreende um polipeptídeo que possuí um domínio variável da cadeia pesada de imunoglobulina, de acordo com uma das reivindicações de 1 a 53, e um polipeptídeo que possuí um domínio variável da cadeia leve de imunoglobulina de acordo com uma das reivindicações de 54 a 61.

63 POLIPEPTÍDEO, incluindo pelo menos dois domínios variáveis de anticorpo compreendendo:

(a) um domínio variável da cadeia pesada do anticorpo compreendendo o polipeptídeo de uma das reivindicações de 1 a 53; e

(b) um domínio variável da cadeia leve do anticorpo compreendendo o polipeptídeo de uma das reivindicações de 54 a 61.

64 POLIPEPTÍDEO, de acordo com uma das reivindicações de 1 a 63, caracterizado pelo fato de que o polipeptídeo é um Fv de cadeia única.

65 POLIPEPTÍDEO, de acordo com uma das reivindicações de 1 a 63, caracterizado pelo fato de que o polipeptídeo é um polipeptídeo Fab.

66 POLIPEPTÍDEO, de acordo com uma das reivindicações de 1 a 58, caracterizado pelo fato de que o polipeptídeo é um polipeptídeo completamente humano.

67 POLIPEPTÍDEO, de acordo com uma das reivindicações de 1 a 66, que compreende adicionalmente das regiões de suporte FR1, FR2, FR3, e/ou FR4 para um polipeptídeo do domínio variável correspondente à

variante de CDRH1, CDRH2, CDRH3, e/ou CDRL3, onde as regiões de suporte são obtidas de um único polipeptídeo modelo.

68 POLIPEPTÍDEO, de acordo com a reivindicação 67, caracterizado pelo fato de que cada uma das regiões de suporte compreende uma seqüência de aminoácidos correspondente a região de suporte das seqüências de aminoácidos do polipeptídeo 4D5 (SEQ ID No: 1 e 2).

69 ANTICORPO, de acordo com a reivindicação 67, caracterizado pelo fato de que o anticorpo consta da região de suporte correspondente a seqüência de aminoácidos da região de suporte variante do anticorpo 4D5 (SEQ ID No: 14-17 e 18-21).

70 POLIPEPTÍDEO, de acordo com uma das reivindicações de 1 a 69, caracterizado pelo fato de que o polipeptídeo compreende adicionalmente de um domínio de dimerização ligado a região C-terminal do polipeptídeo do domínio variável da cadeia pesada.

71 POLIPEPTÍDEO, de acordo com a reivindicação 70, caracterizado pelo fato de que o domínio de dimerização contém um domínio com zíper de leucina ou uma seqüência que possuí pelo menos um resíduo de cisteína.

72 POLIPEPTÍDEO, de acordo com a reivindicação 70, caracterizado pelo fato de que o domínio de dimerização compreende uma região de dobradiça de um polipeptídeo e um zíper de leucina.

73 POLIPEPTÍDEO, de acordo com a reivindicação 70, caracterizado pelo fato de que o domínio de dimerização é uma única cisteína.

74 POLIPEPTÍDEO DE FUSÃO, compreendendo um polipeptídeo de acordo com uma das reivindicações de 1 a 73, caracterizado pelo fato de que o polipeptídeo do domínio variável está fundido a pelo menos uma porção de uma proteína da cápside viral.

75 POLIPEPTÍDEO DE FUSÃO, de acordo com a reivindicação 74, caracterizado pelo fato da cápside viral ser selecionada do

grupo que compreende a proteína pIII, proteína maior da cápside pVIII, Soc, Hoc, gpD, pv1, e variantes destes.

76 POLIPEPTÍDEO DE FUSÃO, de acordo com a reivindicação 75, que consta adicionalmente de um domínio de dimerização entre o domínio variável e a proteína da cápside viral.

77 POLIPEPTÍDEO DE FUSÃO, de acordo com a reivindicação 74, que consta adicionalmente um peptídeo marcado.

78 POLIPEPTÍDEO DE FUSÃO, de acordo com a reivindicação 77, caracterizado pelo fato do peptídeo marcado ser selecionado de um grupo que consiste de gD, c-myc, poli-his, uma proteína fluorescente e B-galactosidase.

79 COMPOSIÇÃO, que contenha um polipeptídeo de uma das reivindicações de 1 a 78 e um veículo.

80 POLINUCLEOTÍDEO, que codifica um polipeptídeo de uma das reivindicações de 1 a 78.

81 VETOR, que contenha o polinucleotídeo da reivindicação 80.

82 CÉLULA HOSPEDEIRA, que contenha o vetor da reivindicação 81.

83 MÉTODO DE PRODUÇÃO DE UM POLIPEPTÍDEO, que compreende no cultivo da célula hospedeira da reivindicação 82 sob condições adequadas para a produção de um polipeptídeo e recuperação do polipeptídeo ou do fragmento de ligação ao antígeno deste.

84 BIBLIOTECA DE POLIPEPTÍDEOS, que compreende uma variedade de polipeptídeos de uma das reivindicações de 1 a 78 e na qual a biblioteca tem pelo menos 1×10^4 seqüências de domínios variáveis de anticorpos.

85 MÉTODO PARA GERAR UMA COMPOSIÇÃO, que incluí uma variedade de polipeptídeos compreendendo em:

(a) produzir uma variedade de polipeptídeos que inclui:

(i) CDRH1 compreende uma seqüência de aminoácidos: G-F-X1-I-X2-X3-X4-X5-I-H, caracterizado pelo fato de que G é posição 26 e X1 é posição 28 de acordo com o sistema de numeração de Kabat; no qual o aminoácido X1 é selecionado de Y e S; X2 é selecionado de Y e S; X3 é selecionado de Y e S; X4 é selecionado de Y e S; e X5 é selecionado de Y e S;

(ii) CDRH2 compreende uma seqüência de aminoácidos: X1-I-X2-P-X3-X4-G-X5-T-X6-Y-A-D-S-V-K-G, caracterizado pelo fato de que X1 é posição 50 de acordo com o sistema de numeração de Kabat ; no qual o aminoácido X1 é selecionado de Y e S; X2 é selecionado de Y e S; X3 é selecionado de Y e S; X4 é selecionado de Y e S; X5 é selecionado de Y e S; e X6 é selecionado de Y e S; e

(iii) CDRH3 compreende uma seqüência de aminoácidos: X1-X2-X3-X4-X5-X6-X7-X8-X9-X10-X11-X12-X13-X14-X15-X16-X17-X18-X19,

caracterizado pelo fato de que X1 é posição 95 de acordo com o sistema de numeração de Kabat, no qual os aminoácidos em cada uma das posições de X1-X17 são selecionados de S e um dentre A, C, F, G, I, L, N, P, R, T, W ou Y, ou não esta presente; X18 é selecionado de G e A; e X19 é selecionado de F, L, I, e M.

86 MÉTODO PARA GERAR UMA COMPOSIÇÃO, que inclui uma variedade de polipeptídeos compreendendo em:

(a) produzir uma variedade de polipeptídeos que inclui:

(i) CDRH1 compreende uma seqüência de aminoácidos: G-F-X1-I-X2-X3-X4-X5-I-H, caracterizado pelo fato de que G é posição 26 e X1 é posição 28 de acordo com o sistema de numeração de Kabat; no qual os aminoácidos em cada uma das posições de X1-X5 são selecionados de S e um dentre Y, W, R e F;

(ii) CDRH2 compreende uma seqüência de aminoácidos: X1-I-X2-P-X3-X4-G-X5-T-X6-Y-A-D-S-V-K-G, caracterizado pelo fato de que X1 é

posição 50 de acordo com o sistema de numeração de Kabat ; no qual os aminoácidos em cada uma das posições de X1-X6 são selecionados de S e um dentre Y, W, R e F; e

(iii) CDRH3 compreende uma seqüência de aminoácidos: X1-X2-X3-X4-X5-X6-X7-X8-X9-X10-X11-X12-X13-X14-X15-X16-X17-X18-X19, caracterizado pelo fato de que X1 é posição 95 de acordo com o sistema de numeração de Kabat, no qual os aminoácidos em cada uma das posições de X1-X19 são selecionados de S e um dentre Y, W, R e , ou não esta presente; no qual X18 é selecionado de G e A; e no qual X19 é selecionado de F, L, I, e M.

87 MÉTODO, de acordo com a reivindicação 85 ou 86, caracterizado pelo fato de que o método compreende em:

(b) produzir uma variedade de polipeptídeos que inclui:

(i) CDKL1 compreendendo uma primeira seqüência consenso hipervariável ou variante desta contendo a substituição em uma ou mais posições comparada a seqüência consenso hipervariável correspondente;

(ii) CDRL2 compreendendo uma segunda seqüência consenso hipervariável ou variante desta contendo a substituição em uma ou mais posições comparada a seqüência consenso hipervariável correspondente; e

(iii) CDRL3 compreendendo uma seqüência de aminoácido: Q-Q-X1-X2-X3-X4-X5-X6-X7-X8-T, no qual X1 é posição 91 de acordo com o sistema de numeração de Kabat; no qual X1 é selecionado de Y e S; no qual X2 é selecionado de Y e S; no qual X3 é selecionado de Y e S; no qual X4 é selecionado de Y e S; no qual X5 é selecionado de Y e S, ou não está presente; no qual X6 é selecionado de Y e S, ou não está presente; no qual X7 é selecionado de P e L; no qual X8 é selecionado de F, L, I, e V.

88 MÉTODO, de acordo com uma das reivindicações de 85 a 86, caracterizado pelo fato de que o método compreende em:

(b) produzir uma variedade de polipeptídeos que inclui:

(i) CDKL1 compreendendo uma primeira seqüência consenso hipervariável ou variante desta contendo a substituição em uma ou mais posições comparada a seqüência consenso hipervariável correspondente;

(ii) CDRL2 compreendendo uma segunda seqüência consenso hipervariável ou variante desta contendo a substituição em uma ou mais posições comparada a seqüência consenso hipervariável correspondente; e

(iii) CDRL3 compreendendo uma seqüência de aminoácido: Q-Q-X1-X2-X3-X4-P-X5-T, no qual X1 é posição 91 de acordo com o sistema de numeração de Kabat; no qual X1 é selecionado de Y e S; no qual X2 é selecionado de Y e S; no qual X3 é selecionado de Y e S; no qual X4 é selecionado de Y e S; no qual X5 é selecionado de Y e S.

89 MÉTODO, de acordo com a reivindicação 85 ou 86, caracterizado pelo fato de que o método compreende em:

(b) produzir uma variedade de polipeptídeos que inclui:

(i) CDRL1 compreendendo uma primeira seqüência consenso hipervariável ou variante desta contendo a substituição em uma ou mais posições comparada a seqüência consenso hipervariável correspondente;

(ii) CDRL2 compreendendo uma segunda seqüência consenso hipervariável ou variante desta contendo a substituição em uma ou mais posições comparada a seqüência consenso hipervariável correspondente; e

(iii) CDRL3 compreende uma seqüência de aminoácidos: Q-Q-F-X1-I-X2-X3-X4-X5-I-H, caracterizado pelo fato de que G é posição 26 e X1 é posição 28 de acordo com o sistema de numeração de Kabat; no qual os aminoácidos em cada uma das posições de X1-X5 são selecionados de S e um dentre Y, W, R e F;

90 MÉTODO PARA GERAR UMA COMPOSIÇÃO, que inclui uma variedade de polipeptídeos que compreende em:

(a) produzir uma variedade de polipeptídeos que inclui:

(i) CDRH1 compreende uma seqüência de aminoácidos: G-F-X1-I-X2-X3-X4-X5-I-H, caracterizado pelo fato de que G é posição 26 e X1 é posição 28 de acordo com o sistema de numeração de Kabat; no qual o aminoácido X1 é selecionado de Y e S; X2 é selecionado de Y e S; X3 é selecionado de Y e S; X4 é selecionado de Y e S; e X5 é selecionado de Y e S;

(ii) CDRH2 compreende uma seqüência de aminoácidos: X1-I-X2-P-X3-X4-G-X5-T-X6-Y-A-D-S-V-K-G, caracterizado pelo fato de que X1 é posição 50 de acordo com o sistema de numeração de Kabat ; no qual o aminoácido X1 é selecionado de Y e S; X2 é selecionado de Y e S; X3 é selecionado de Y e S; X4 é selecionado de Y e S; X5 é selecionado de Y e S; e X6 é selecionado de Y e S. e

(iii) CDRH3 compreende uma seqüência de aminoácidos: X1-X2-X3-X4-X5-X6-X7-X8-X9-X10-X11-X12-X13-X14-X15-X16-X17-X18-X19-D-Y, caracterizado pelo fato de que X1 é posição 95 de acordo com o sistema de numeração de Kabat, no qual os aminoácidos em cada uma das posições de X1-X6 são selecionados de um *pool* de aminoácidos em uma relação molar de 50% de Y, 25% de S e 25% de G, e X18 é selecionado de G e A, e X19 é selecionado de I, M, L, e F.

91 MÉTODO PARA GERAR UMA COMPOSIÇÃO, que inclui uma variedade de polipeptídeos que compreende em:

(a) produzir uma variedade de polipeptídeos que inclui:

(i) CDRH1 compreende uma seqüência de aminoácidos: G-F-X1-I-X2-X3-X4-X5-I-H, caracterizado pelo fato de que G é posição 26 e X1 é posição 28 de acordo com o sistema de numeração de Kabat; no qual o aminoácido X1 é selecionado de Y e S; X2 é selecionado de Y e S; X3 é selecionado de Y e S; X4 é selecionado de Y e S; e X5 é selecionado de Y e S;

(ii) CDRH2 compreende uma seqüência de aminoácidos: X1-I-X2-P-X3-X4-G-X5-T-X6-Y-A-D-S-V-K-G, caracterizado pelo fato de que X1 é

posição 50 de acordo com o sistema de numeração de Kabat ; no qual o aminoácido X1 é selecionado de Y e S; X2 é selecionado de Y e S; X3 é selecionado de Y e S; X4 é selecionado de Y e S; X5 é selecionado de Y e S; e X6 é selecionado de Y e S; e

(iii) CDRH3 compreende uma seqüência de aminoácidos: X1-X2-X3-X4-X5-X6-X7-X8-X9-X10-X11-X12-X13-X14-X15-X16-X17-X18-X19-D-Y, no qual X1 é posição 95 de acordo com o sistema de numeração de Kabat, caracterizada pelo fato dos aminoácidos em cada uma das posições de X1-X6 serem selecionados de um *pool* de aminoácidos numa razão molar de 25% de Y, 50% de S, e 25% de R; no qual os aminoácidos em cada uma das posições de X7-X17 serem selecionados de um *pool* de aminoácidos numa razão molar de 25% de Y, 50% de S e 25% de R, ou não estarem presentes; no qual X18 é selecionado de G e A, e no qual X19 é selecionado de I, M, L e F.

92 MÉTODO PARA GERAR UMA COMPOSIÇÃO, que inclui uma variedade de polipeptídeos que compreende em:

(a) produzir uma variedade de polipeptídeos que inclui:

(i) CDRH1 compreende uma seqüência de aminoácidos: G-F-X1-I-X2-X3-X4-X5-I-H, caracterizado pelo fato de que G é posição 26 e X1 é posição 28 de acordo com o sistema de numeração de Kabat; no qual o aminoácido X1 é selecionado de Y e S; X2 é selecionado de Y e S; X3 é selecionado de Y e S; X4 é selecionado de Y e S; e X5 é selecionado de Y e S;

(ii) CDRH2 compreende uma seqüência de aminoácidos: X1-I-X2-P-X3-X4-G-X5-T-X6-Y-A-D-S-V-K-G, caracterizado pelo fato de que X1 é posição 50 de acordo com o sistema de numeração de Kabat ; no qual o aminoácido X1 é selecionado de Y e S; X2 é selecionado de Y e S; X3 é selecionado de Y e S; X4 é selecionado de Y e S; X5 é selecionado de Y e S; e X6 é selecionado de Y e S. e

(iii) CDRH3 compreende uma seqüência de aminoácidos: X1-X2-

X3-X4-X5-X6-X7-X8-X9-X10-X11-X12-X13-X14-X15-X16-X17-X18-X19-D-Y (SEQ ID No ED: 27), no qual X1 é posição 95 de acordo com o sistema de numeração de Kabat, caracterizada pelo fato dos aminoácidos em cada uma das posições de X1-X6 serem selecionados de um *pool* de aminoácidos numa razão molar de 38% de Y, 25% de S, e 25% de G e 12% de R; caracterizada pelo fato dos aminoácidos em cada uma das posições de X7-X17 serem selecionados de um *pool* de aminoácidos numa razão molar de 38% de Y, 25% de S, e 25% de G e 12% de R, ou não estarem presentes; no qual X18 é selecionado de G e A, e no qual X19 é selecionado de I, M, L e F.

93 MÉTODO PARA GERAR UMA COMPOSIÇÃO, que inclui uma variedade de polipeptídeos que compreende em:

(a) produzir uma variedade de polipeptídeos que inclui:

(i) CDRH1 compreende uma seqüência de aminoácidos: G-F-X1-I-X2-X3-X4-X5-I-H, caracterizado pelo fato de que G é posição 26 e X1 é posição 28 de acordo com o sistema de numeração de Kabat; no qual o aminoácido X1 é selecionado de Y e S; X2 é selecionado de Y e S; X3 é selecionado de Y e S; X4 é selecionado de Y e S; e X5 é selecionado de Y e S;

(ii) CDRH2 compreende uma seqüência de aminoácidos: X1-I-X2-P-X3-X4-G-X5-T-X6-Y-A-D-S-V-K-G, caracterizado pelo fato de que X1 é posição 50 de acordo com o sistema de numeração de Kabat ; no qual o aminoácido X1 é selecionado de Y e S; X2 é selecionado de Y e S; X3 é selecionado de Y e S; X4 é selecionado de Y e S; X5 é selecionado de Y e S; e X6 é selecionado de Y e S. e

(iii) CDRH3 compreende uma seqüência de aminoácidos: X1-X2-X3-X4-X5-X6-X7-X8-X9-X10-X11-X12-X13-X14-X15-X16-X17-X18-X19-D-Y (SEQ ID No ED: 28), no qual X1 é posição 95 de acordo com o sistema de numeração de Kabat, caracterizada pelo fato dos aminoácidos em cada uma das posições de X1-X6 serem selecionados de um *pool* de aminoácidos numa

razão molar de 20% de Y, 26% de S, 26% de G, 13% de R, 1% de A, 1% de D, 1% de E, 1% de F, 1% de H, 1% de I, 1% de K, 1% de L, 1% de M, 1% de N, 1% de P, 1% de Q, 1% de T, 1% de V e 1% de W; caracterizada pelo fato dos aminoácidos em cada uma das posições de X7-X17 serem selecionados de um *pool* de aminoácidos numa razão molar de 20% de Y, 26% de S, 26% de G, 13% de R, 1% de A, 1% de D, 1% de E, 1% de F, 1% de H, 1% de I, 1% de K, 1% de L, 1% de M, 1% de N, 1% de P, 1% de Q, 1% de T, 1% de V e 1% de W, ou não estão presentes; no qual X18 é selecionado de G e A, e no qual X19 é selecionado de I, M, L e F.

94 MÉTODO, de uma das reivindicações de 90 a 93, caracterizado pelo fato de que o método consta adicionalmente:

(b) da produção de uma variedade de polipeptídeos que inclui:

(i) CDRL1 compreende uma primeira seqüência consenso hipervariável ou variante desta contendo uma substituição em uma ou mais posições, em comparação com a seqüência consenso hipervariável correspondente;

(ii) CDRL2 compreende uma segunda seqüência consenso hipervariável ou variante desta contendo uma substituição em uma ou mais posições, em comparação com a seqüência consenso hipervariável correspondente, e

(iii) CDRL3 compreende a seqüência de aminoácidos Q-Q-X1-X2-X3-X4-P-X5-T, no qual X1 é posição 91 de acordo com a numeração de Kabat e é selecionado de S e Y; no qual, X2 é selecionado de S e Y; no qual, X3 é selecionado de Y e S; no qual, X4 é selecionado de Y e S; no qual, X5 é selecionado de Y e S.

95 MÉTODO, de uma das reivindicações de 87 a 89 ou 94, caracterizado pelo fato de que a primeira seqüência de consenso hipervariável compreende uma seqüência de consenso CDRL1 Kabat.

96 MÉTODO, de acordo com a reivindicação 95, caracterizado pelo fato de que a primeira seqüência de consenso hipervariável é R-A-S-Q-D-V-N-T-A-V-A (ID SEQ NO: 29).

97 MÉTODO, de uma das reivindicações de 87 a 89 ou 94, caracterizado pelo fato de que a segunda seqüência de consenso hipervariável compreende uma seqüência de consenso CDRL2 Kabat.

98 MÉTODO, de acordo com a reivindicação 97, caracterizado pelo fato de que a segunda seqüência de consenso hipervariável é S-A-S-S-L-Y-S (SEQ ID NO:30).

99 MÉTODO, de uma das reivindicações de 85 a 98, caracterizado pelo fato de que a variedade de polipeptídeos são codificados por uma variedade de polinucleotídeos.

100 MÉTODO PARA A SELEÇÃO DE UM DOMÍNIO VARIÁVEL LIGANTE AO ANTÍGENO, que se liga a um antígeno alvo a partir de uma biblioteca de domínios variáveis de anticorpos, compreendendo na:

(a) interação da biblioteca da reivindicação 84 com o antígeno alvo;

(b) separação de um ou mais polipeptídeos que ligam especificamente ao antígeno alvo dos polipeptídeos que não se ligam especificamente ao antígeno alvo, recuperando um ou mais polipeptídeos que se ligam especificamente ao antígeno alvo e incubando um ou mais polipeptídeos que se ligam especificamente ao antígeno alvo em uma série de soluções que consiste em diminuir a quantidade de antígeno alvo a uma concentração de cerca de 0,1 nM a cerca de 1000 nN, e

(c) Seleção de um ou mais polipeptídeos que se ligam especificamente ao antígeno alvo e que podem ligar-se a uma baixa concentração de antígeno alvo ou que possuem uma afinidade de cerca de 0,1 nM a 200 nM.

101 MÉTODO, de acordo com a reivindicação 100, caracterizado pelo fato de que o antígeno é HER2 ou DR5.

102 MÉTODO, de acordo com a reivindicação 100, caracterizado pelo fato da concentração do antígeno alvo ser cerca de 100 a 250 nM.

103 MÉTODO, de acordo com a reivindicação 100, caracterizado pelo fato da concentração do antígeno alvo ser cerca de 25 a 100 nM.

104 MÉTODO PARA SELECIONAR POLIPEPTÍDEOS, que se ligam a antígenos alvos de uma biblioteca de polipeptídeos, compreendendo em:

(a) isolar um ou mais polipeptídeos que ligam-se especificamente ao antígeno alvo pela interação à uma biblioteca que contenha uma variedade de polipeptídeos de uma das reivindicações de 1 a 79 com um antígeno alvo imobilizado sob condições adequadas para a ligação;

(b) separar um ou mais polipeptídeos que ligam-se especificamente ao antígeno alvo dos polipeptídeos que não se ligam especificamente ao antígeno alvo, e recuperar um ou mais polipeptídeos que se ligam especificamente ao antígeno alvo para obter uma subpopulação enriquecida para um ou mais polipeptídeos que se ligam especificamente ao antígeno alvo; e

(c) opcionalmente, repetir as etapas (a) - (b) pelo menos duas vezes, cada repetição usando a subpopulação enriquecida para a um ou mais polipeptídeos que ligam especificamente ao antígeno alvo obtido a partir do último ciclo de seleção.

105 MÉTODO, de acordo com a reivindicação 104, compreendendo adicionalmente em:

(d) incubar a subpopulação com uma concentração de antígeno alvo marcado em um intervalo de cerca de 0,1 nM a 1000 nN para formar uma mistura, sob condições adequadas para ligação;

(e) interagir a mistura com um agente imobilizado que se liga

no antígeno alvo marcado;

(f) detectar a um ou mais polipeptídeos que ligam-se especificamente ao antígeno alvo marcado, e recuperar um ou mais polipeptídeos que liga-se especificamente ao antígeno alvo marcado do antígeno alvo marcado; e

(g) opcionalmente, repetir as etapas de (d) a (f) por pelo menos duas vezes, cada repetição usando a subpopulação enriquecida para um ou mais polipeptídeos que ligam-se especificamente ao antígeno alvo marcado obtido a partir do última ciclo de seleção, utilizando uma concentração menor de antígeno alvo marcado do que no ciclo de seleção anterior.

106 MÉTODO, de acordo com a reivindicação 105, compreendendo ainda da adição de um excesso de antígeno alvo não marcado na mistura e incubar a mistura por um período de tempo suficiente para recuperar um ou mais polipeptídeos que se ligam especificamente ao antígeno alvo com baixa afinidade.

107 MÉTODO PARA ISOLAR UM OU MAIS POLIPEPTÍDEOS, que se ligam especificamente a um antígeno alvo com alta afinidade, compreendendo em:

(a) Interagir uma biblioteca que consiste em uma variedade de polipeptídeos de uma das reivindicações de 1 a 79 com um antígeno alvo a uma concentração de, pelo menos, 0,1 nM a 1000 nN para isolar um ou mais polipeptídeos que se ligam especificamente ao antígeno alvo;

(b) recuperar um ou mais polipeptídeos que ligam especificamente ao antígeno alvo a partir do antígeno alvo para obter uma subpopulação enriquecida para uma ou mais polipeptídeos que se ligam especificamente ao antígeno alvo; e

(c) opcionalmente repetir as etapas (a) e (b) por pelo menos duas vezes, cada repetição usando a subpopulação obtidos a partir da última etapa

de e usando uma concentração decrescente de antígeno alvo do que utilizada na etapa anterior para isolar um ou mais polipeptídeos que se ligam especificamente ao antígeno alvo em uma concentração menor de antígeno alvo.

108 MÉTODO PARA O TRATAMENTO DE CÂNCER, em um mamífero, compreendendo em administrar um polipeptídeo de uma das reivindicações de 1 a 79 aos mamíferos.

109 MÉTODO, de acordo com a reivindicação 108, caracterizado pelo fato do câncer ser selecionado de câncer de mama, câncer coloretal, câncer de pulmão de não-pequenas células, linfoma não-Hodgkin (NHL), câncer renal, câncer de próstata, câncer de fígado, câncer de cabeça e pescoço, melanoma, câncer de ovário, mesotelioma e mieloma múltiplo.

110 MÉTODO, de acordo com a reivindicação 108 ou 109, caracterizado pelo fato de que o anticorpo é um anticorpo anti-HER2.

111 MÉTODO, de acordo com a reivindicação 108 ou 109, caracterizado pelo fato de que o anticorpo é um anticorpo anti-DR5.

112 MÉTODO, de acordo com uma das reivindicações de 108 a 111, caracterizado pelo fato de que o tratamento inclui a etapa adicional de administração de um segundo agente terapêutico simultaneamente ou seqüencialmente com o anticorpo.

113 MÉTODO, de acordo com a reivindicação 112, caracterizado pelo fato de que o segundo agente terapêutico é selecionado de um agente antiangiogênico, antineoplásico, agente quimioterápico e agente citotóxico.

114 MÉTODO, de acordo com a reivindicação 113, caracterizado pelo fato de que o agente antiangiogênico é um anticorpo anti-hVEGF.

115 MÉTODO PARA TRATAR, um mamífero que sofre ou possui risco de desenvolver uma doença inflamatória ou autoimune, compreendendo a etapa de tratamento do mamífero com um anticorpo de uma das reivindicações de 1 a17.

116 MÉTODO, de acordo com a reivindicação 115, caracterizado pelo fato de que a doença inflamatória ou autoimune é artrite reumatóide.

117 MÉTODO, de acordo com a reivindicação 115 ou 116, caracterizado pelo fato de que o anticorpo é um anticorpo anti-DR5.

Fig. 1

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Val Asn Thr Ala Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Ser Ala Ser Ser Leu Tyr Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Arg Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln His Tyr Thr Thr Pro Pro Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr

(SEQ ID NO:1)

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Asn Ile Lys Asp Thr Tyr Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ala Arg Ile Tyr Pro Thr Asn Gly Tyr Thr Arg Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ser Arg Trp Gly Gly Asp Gly Phe Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

(SEQ ID NO:2)

Fig. 2

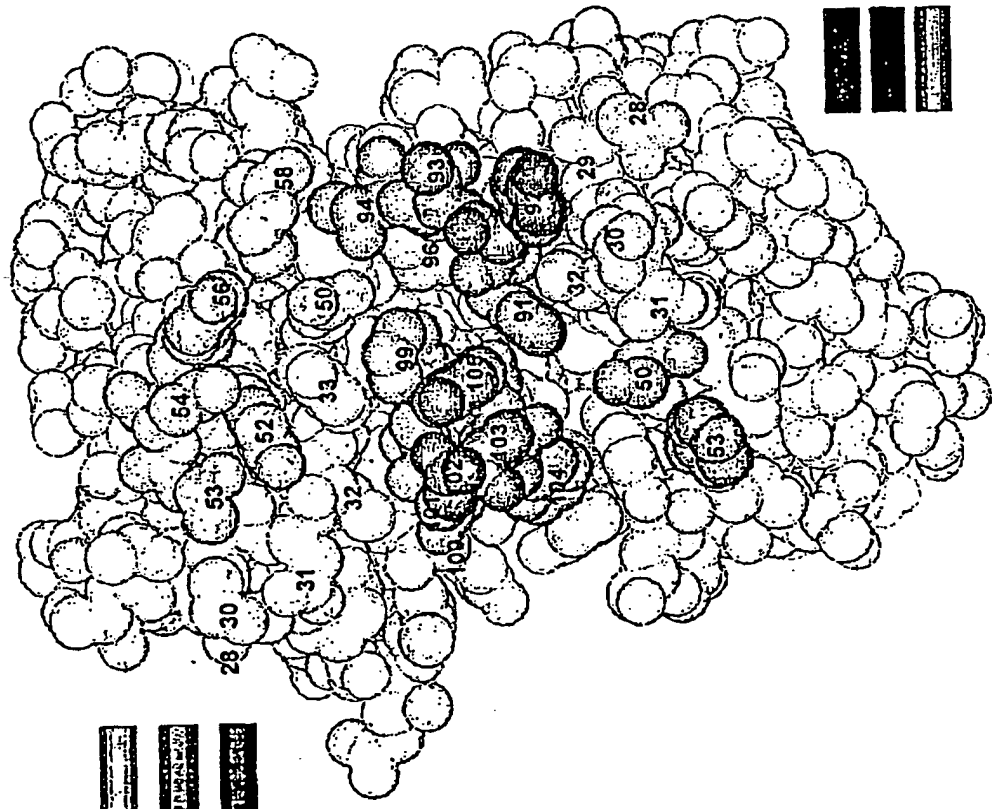

28, 30, 31, 32, 33 CDR-H1
50, 52, 53, 54, 56, 58 CDR-H2
CDR-H3
CDR-L3 (91, 92, 93, 94, 96)
CDR-L2 (50, 53)
CDR-L1 (28, 29, 30, 31, 32)

Fig. 3

Frequência LC

28	S	N	V	D	G	I	T	L	X			
	511	262	258	186	178	44	39	16	35			
29	I	S	V	G	N	X						
	612	272	254	192	147	70						
30	S	N	K	G	R	Y	T	D	A	X		
	849	176	169	86	81	63	29	28	17	45		
31	S	N	T	R	I	D	K	G	X			
	676	496	170	47	29	28	25	18	53			
32	Y	N	W	F	S	D	R	X				
	1055	128	97	77	61	40	25	69				
50	G	A	D	W	K	L	E	S	X			
	386	341	294	151	116	91	39	30	82			
53	S	N	T	K	I	R	X					
	545	438	407	41	23	23	58					
91	Y	S	R	A	G	H	X					
	849	196	169	118	61	41	148					
92	Y	G	N	S	D	L	T	H	I	X		
	362	356	248	193	114	94	64	43	38	91		
93	S	N	Q	T	H	G	D	R	X			
	738	346	117	101	66	51	47	35	112			
94	S	T	W	Y	L	F	A	P	V	I	N	X
	386	365	288	172	114	79	46	43	33	24	18	40
96	L	Y	W	F	I	R	P	X				
	264	205	176	140	117	115	46	121				

Fig. 4

Frequência HC

28	T	S	X									
	1922	1297	357									
30	S	T	N	R	D	G	X					
	2451	655	154	92	70	67	128					
31	S	N	G	T	D	R	A	X				
	1815	452	365	359	324	280	32	190				
32	Y	S	N	G	F	A	X					
	2331	332	269	138	124	120	516					
33	A	Y	W	G	S	D	T	N	V	X		
	785	713	605	501	431	117	98	90	71	206		
49	G	S	A									
	2137	814	706									
50	R	Y	W	V	G	I	E	A	S	N	L	X
	633	361	354	345	338	316	305	234	233	219	155	287
52	S	Y	N	K	I	R	D	T	X			
	988	940	657	299	203	127	123	100	332			
52	P	Y	S	G	A	Q	S					
A	833	521	434	287	155	118	549					
53	S	D	Y	G	H	N	I	T	W	X		
	915	755	395	374	320	314	182	109	77	316		
54	G	S	D	N	K	F	T	X				
	1403	971	433	249	224	187	134	170				
55	G	S	W	D	T	X						
	1986	852	248	186	115	390						
56	S	T	N	D	Y	E	G	A	X			
	1039	601	549	394	381	201	175	83	344			
57	T	K	I	A	N	X						
	2120	553	294	266	230	309						
58	Y	N	D	R	S	I	T	H	X			
	1228	941	445	283	166	155	120	94	351			
71	R	V	A									
	1970	627	527									
93	A	S										
	3761	32										
94	R	K	T									
	3050	671	290									

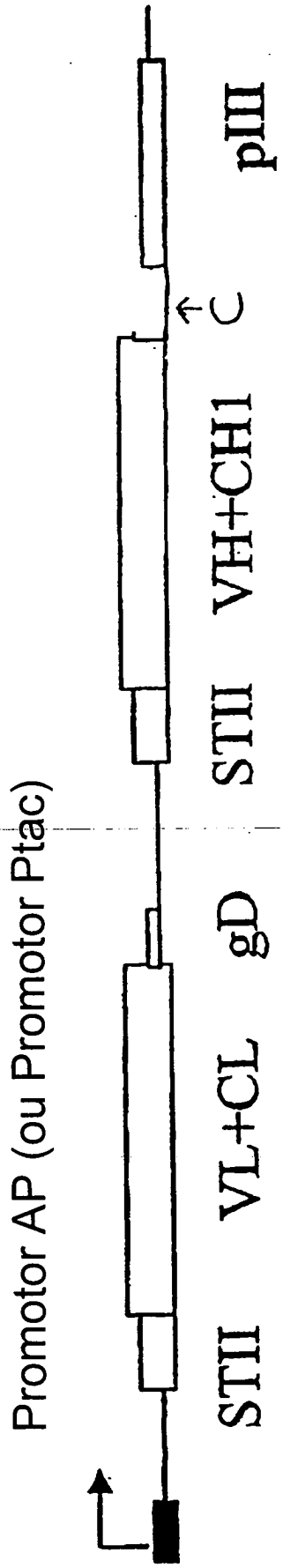

Promotor AP (ou Promotor Ptac)
STII
VL+CL
gD
(ou MalE)
Marcador
STII
VH+CH1
C
pIII
Fab-C
$C_H1-C\rightarrow cP3$

Fig. 5

Fig. 6

Sequências de estrutura da cadeia leve de huMAb4D5-8

LC-FR1 [1]Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys[23] (SEQ ID NO:6)

LC-FR2 [35]Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr[49] (SEQ ID NO:7)

LC-FR3 [57]Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Arg Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys[88] (SEQ ID NO:8)

LC-FR4 [98]Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys[107] (SEQ ID NO:9)

Sequências de estrutura da cadeia pesada de huMAb4D5-8

HC-FR1 [1]Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser[25] (SEQ ID NO:10)

HC-FR2 [36]Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val[48] (SEQ ID NO:11)

HC-FR3 [66]Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala Tyr Leu Gln Met Asn[83] Ser[83a] Leu[83b] Arg[83c] Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys[92] (SEQ ID NO:12)

HC-FR4 [103]Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser[113] (SEQ ID NO: 13)

Fig. 7

Sequências de estrutura da cadeia leve de huMAb4D5-8 modificada na posição 66 (sublinhado)

LC-FR1 [1]Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys[23] (SEQ ID NO:14)

LC-FR2 [35]Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr[49] (SEQ ID NO:15)

LC-FR3 [57]Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys[88] (SEQ ID NO:16)

LC-FR4 [98]Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys[107] (SEQ ID NO:17)

Sequências de estrutura da cadeia pesada de huMAb4D5-8 modificada nas posições 71, 73 e 78 (sublinhado)

HC-FR1 [1]Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser[25] (SEQ ID NO:18)

HC-FR2 [36]Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val[48] (SEQ ID NO:19)

HC-FR3 [66]Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn[83] Ser[83a] Leu[83b] Arg[83c] Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys[92] (SEQ ID NO:20)

HC-FR4 [103]Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser[113] (SEQ ID NO:21)

		Biblioteca YSGR-A		Biblioteca YSGR-A		Biblioteca YSGR-A		Biblioteca YSGR-A	
CDR	Posição	Tipo de aminoácido	Razão molar de aminoácido	Tipo de aminoácido	Razão molar de aminoácido	Tipo de aminoácido	Razão molar de aminoácido	Tipo de aminoácido	Razão molar de aminoácido
L3	91	Y, S	50, 50	Y, S	50, 50	Y, S	50, 50	Y, S	50, 50
	92	Y, S	50, 50	Y, S	50, 50	Y, S	50, 50	Y, S	50, 50
	93	Y, S	50, 50	Y, S	50, 50	Y, S	50, 50	Y, S	50, 50
	94	Y, S	50, 50	Y, S	50, 50	Y, S	50, 50	Y, S	50, 50
	96	Y, S	50, 50	Y, S	50, 50	Y, S	50, 50	Y, S	50, 50
H1	28	Y, S	50, 50	Y, S	50, 50	Y, S	50, 50	Y, S	50, 50
	30	Y, S	50, 50	Y, S	50, 50	Y, S	50, 50	Y, S	50, 50
	31	Y, S	50, 50	Y, S	50, 50	Y, S	50, 50	Y, S	50, 50
	32	Y, S	50, 50	Y, S	50, 50	Y, S	50, 50	Y, S	50, 50
	33	Y, S	50, 50	Y, S	50, 50	Y, S	50, 50	Y, S	50, 50
H2	50	Y, S	50, 50	Y, S	50, 50	Y, S	50, 50	Y, S	50, 50
	52	Y, S	50, 50	Y, S	50, 50	Y, S	50, 50	Y, S	50, 50
	53	Y, S	50, 50	Y, S	50, 50	Y, S	50, 50	Y, S	50, 50
	54	Y, S	50, 50	Y, S	50, 50	Y, S	50, 50	Y, S	50, 50
	56	Y, S	50, 50	Y, S	50, 50	Y, S	50, 50	Y, S	50, 50
	58	Y, S	50, 50	Y, S	50, 50	Y, S	50, 50	Y, S	50, 50
H3	95								
	96								
	97	Y, S, G	50, 25, 25	Y, S, R	25, 50, 25	Y, S, G, R	33, 25, 25, 17	Y, S, G, R, A, D, E, F, H, I, K, L, M, N, P, Q, T, V, W	20, 26, 26, 13, 1, 1, 1, 1, 1, 1, 1, 1, 1, 1, 1, 1, 1, 1, 1
	98								
	99								
	100								
	100a								
	100b	G, A	50, 50	G, A	50, 50	G, A	50, 50	G, A	50, 50
	100c	I, M, L, F	25, 25, 25, 25	I, M, L, F	25, 25, 25, 25	I, M, L, F	25, 25, 25, 25	I, M, L, F	25, 25, 25, 25

Fig. 8

Fig. 9A

Oligonucleotídeos mutagênicos utilizados na construção das bibliotecas YSGR-A, YSGR-B, YSGR-C e YSGR-D, degenerações de DNA equimolar são representadas no código IUB (W=A/T, K=G/T, M=A/C, S=G/C, Y=T/C, R=A/G e N=A/T/G/C). A notação "XXX" representa os codons que codificam Tyr/Ser/Gly nas razões molares de 50/25/25, respectivamente

H1
GCA GCT TCT GGC TTC TMT ATT TMT TMT TMT TMT ATA CAC TGG GTG CGT (SEQ ID NO:32)

H2
CTG GAA TGG GTT GCA TMT ATT TMT CCA TMT TMT GGT TMT ACT TMT TAT GCC CAT AGC GTC (SEQ ID NO:33)

L3
ACT TAT TAC TGT CAG CAA TMT TMT TMT TMT CCA TMT ACG TTC GGA CAG GGT ACC (SEQ ID NO:34)

H3-A6
GTC TAT TAT TGT GCT CGC XXX XXX XXX XXX XXX XXX GST WTK GAC TAC TGG GGT CAA GGA (SEQ ID NO:35)

H3-A7
GTC TAT TAT TGT GCT CGC XXX XXX XXX XXX XXX XXX XXX GST WTK GAC TAC TGG GGT CAA GGA (SEQ ID NO:36)

H3-A8
GTC TAT TAT TGT GCT CGC XXX XXX XXX XXX XXX XXX XXX XXX GST WTK GAC TAC TGG GGT CAA GGA (SEQ ID NO:37)

H3-A9
GTC TAT TAT TGT GCT CGC XXX XXX XXX XXX XXX XXX XXX XXX XXX GST WTK GAC TAC TGG GGT CAA GGA (SEQ ID NO:38)

H3-A10
GTC TAT TAT TGT GCT CGC XXX XXX XXX XXX XXX XXX XXX XXX XXX XXX GST WTK GAC TAC TGG GGT CAA GGA (SEQ ID NO:39)

H3-A11
GTC TAT TAT TGT GCT CGC XXX XXX XXX XXX XXX XXX XXX XXX XXX XXX XXX GST WTK GAC TAC TGG GGT CAA GGA (SEQ ID NO:40)

H3-A12
GTC TAT TAT TGT GCT CGC XXX XXX XXX XXX XXX XXX XXX XXX XXX XXX XXX XXX GST WTK GAC TAC TGG GGT CAA GGA (SEQ ID NO:41)

H3-A13
GTC TAT TAT TGT GCT CGC XXX XXX XXX XXX XXX XXX XXX XXX XXX XXX XXX XXX XXX GST WTK GAC TAC TGG GGT CAA GGA (SEQ ID NO:42)

H3-A14
GTC TAT TAT TGT GCT CGC XXX XXX XXX XXX XXX XXX XXX XXX XXX XXX XXX XXX XXX XXX GST WTK GAC TAC TGG GGT CAA GGA (SEQ ID NO:43)

H3-A15
GTC TAT TAT TGT GCT CGC XXX XXX XXX XXX XXX XXX XXX XXX XXX XXX XXX XXX XXX XXX GST WTK GAC TAC TGG GGT CAA GGA (SEQ ID NO:44)

H3-A16
GTC TAT TAT TGT GCT CGC XXX XXX XXX XXX XXX XXX XXX XXX XXX XXX XXX XXX XXX XXX XXX GST WTK GAC TAC TGG GGT CAA GGA (SEQ ID NO:45)

H3-A17
GTC TAT TAT TGT GCT CGC XXX XXX XXX XXX XXX XXX XXX XXX XXX XXX XXX XXX XXX XXX XXX XXX GST WTK GAC TAC TGG GGT CAA GGA (SEQ ID NO:46)

Fig. 9B

Oligonucleotídeos mutagênicos utilizados na construção das bibliotecas YSGR-B, degenerações de DNA equimolar são representadas no código IUB (W=A/T, K=G/T, M=A/C, S=G/C, Y=T/C, R=A/G e N=A/T/G/C). A notação "XXX" representa os codons que codificam Tyr/Ser/Arg nas razões molares de 25/50/25, respectivamente

H3-B6
GTC TAT TAT TGT GCT CGC XXX XXX XXX XXX XXX XXX GST WTK GAC TAC TGG GGT CAA GGA (SEQ ID NO:47)

H3-B7
GTC TAT TAT TGT GCT CGC XXX XXX XXX XXX XXX XXX XXX GST WTK GAC TAC TGG GGT CAA GGA (SEQ ID NO:48)

H3-B8
GTC TAT TAT TGT GCT CGC XXX XXX XXX XXX XXX XXX XXX XXX GST WTK GAC TAC TGG GGT CAA GGA (SEQ ID NO:49)

H3-B9
GTC TAT TAT TGT GCT CGC XXX XXX XXX XXX XXX XXX XXX XXX XXX GST WTK GAC TAC TGG GGT CAA GGA (SEQ ID NO:50)

H3-B10
GTC TAT TAT TGT GCT CGC XXX XXX XXX XXX XXX XXX XXX XXX XXX XXX GST WTK GAC TAC TGG GGT CAA GGA (SEQ ID NO:51)

H3-B11
GTC TAT TAT TGT GCT CGC XXX XXX XXX XXX XXX XXX XXX XXX XXX XXX XXX GST WTK GAC TAC TGG GGT CAA GGA (SEQ ID NO:52)

H3-B12
GTC TAT TAT TGT GCT CGC XXX XXX XXX XXX XXX XXX XXX XXX XXX XXX XXX XXX GST WTK GAC TAC TGG GGT CAA GGA (SEQ ID NO:53)

H3-B13
GTC TAT TAT TGT GCT CGC XXX XXX XXX XXX XXX XXX XXX XXX XXX XXX XXX XXX XXX GST WTK GAC TAC TGG GGT CAA GGA (SEQ ID NO:54)

H3-B14
GTC TAT TAT TGT GCT CGC XXX XXX XXX XXX XXX XXX XXX XXX XXX XXX XXX XXX XXX XXX GST WTK GAC TAC TGG GGT CAA GGA (SEQ ID NO:55)

H3-B15
GTC TAT TAT TGT GCT CGC XXX XXX XXX XXX XXX XXX XXX XXX XXX XXX XXX XXX XXX XXX XXX GST WTK GAC TAC TGG GGT CAA GGA (SEQ ID NO:56)

H3-B16
GTC TAT TAT TGT GCT CGC XXX XXX XXX XXX XXX XXX XXX XXX XXX XXX XXX XXX XXX XXX XXX XXX GST WTK GAC TAC TGG GGT CAA GGA (SEQ ID NO:57)

H3-B17
GTC TAT TAT TGT GCT CGC XXX XXX XXX XXX XXX XXX XXX XXX XXX XXX XXX XXX XXX XXX XXX XXX XXX GST WTK GAC TAC TGG GGT CAA GGA (SEQ ID NO:58)

Fig. 9C

Oligonucleotídeos mutagênicos utilizados na construção das bibliotecas YSGR-C, degenerações de DNA equimolar são representadas no código IUB (W=A/T, K=G/T, M=A/C, S=G/C, Y=T/C, R=A/G e N=A/T/G/C). A notação "XXX" representa os codons que codificam Tyr/Ser/Gly/Arg nas razões molares de 38/25/25/12, respectivamente.

H3-C6
GTC TAT TAT TGT GCT CGC XXX XXX XXX XXX XXX XXX GST WTK GAC TAC TGG GGT CAA GGA (SEQ ID NO:59)

H3-C7
GTC TAT TAT TGT GCT CGC XXX XXX XXX XXX XXX XXX XXX GST WTK GAC TAC TGG GGT CAA GGA (SEQ ID NO:60)

H3-C8
GTC TAT TAT TGT GCT CGC XXX XXX XXX XXX XXX XXX XXX XXX GST WTK GAC TAC TGG GGT CAA GGA (SEQ ID NO:61)

H3-C9
GTC TAT TAT TGT GCT CGC XXX XXX XXX XXX XXX XXX XXX XXX XXX GST WTK GAC TAC TGG GGT CAA GGA (SEQ ID NO:62)

H3-C10
GTC TAT TAT TGT GCT CGC XXX XXX XXX XXX XXX XXX XXX XXX XXX XXX GST WTK GAC TAC TGG GGT CAA GGA (SEQ ID NO:63)

H3-C11
GTC TAT TAT TGT GCT CGC XXX XXX XXX XXX XXX XXX XXX XXX XXX XXX XXX GST WTK GAC TAC TGG GGT CAA GGA (SEQ ID NO:64)

H3-C12
GTC TAT TAT TGT GCT CGC XXX XXX XXX XXX XXX XXX XXX XXX XXX XXX XXX XXX GST WTK GAC TAC TGG GGT CAA GGA (SEQ ID NO:65)

H3-C13
GTC TAT TAT TGT GCT CGC XXX XXX XXX XXX XXX XXX XXX XXX XXX XXX XXX XXX XXX GST WTK GAC TAC TGG GGT CAA GGA (SEQ ID NO:66)

H3-C14
GTC TAT TAT TGT GCT CGC XXX XXX XXX XXX XXX XXX XXX XXX XXX XXX XXX XXX XXX XXX GST WTK GAC TAC TGG GGT CAA GGA (SEQ ID NO:67)

H3-C15
GTC TAT TAT TGT GCT CGC XXX XXX XXX XXX XXX XXX XXX XXX XXX XXX XXX XXX XXX XXX XXX GST WTK GAC TAC TGG GGT CAA GGA (SEQ ID NO:68)

H3-C16
GTC TAT TAT TGT GCT CGC XXX XXX XXX XXX XXX XXX XXX XXX XXX XXX XXX XXX XXX XXX XXX XXX GST WTK GAC TAC TGG GGT CAA GGA (SEQ ID NO:69)

H3-C17
GTC TAT TAT TGT GCT CGC XXX XXX XXX XXX XXX XXX XXX XXX XXX XXX XXX XXX XXX XXX XXX XXX XXX XXX GST WTK GAC TAC TGG GGT CAA GGA (SEQ ID NO:70)

Fig. 9D

Oligonucleotídeos mutagênicos utilizados na construção das bibliotecas YSGR-D, degenerações de DNA equimolar são representadas no código IUB (W=A/T, K=G/T, M=A/C, S=G/C, Y=T/C, R=A/G e N=A/T/G/C). A notação "XXX" representa os codons que codificam Tyr/Ser/Gly/Arg/Ala/Asp/Glu/Phe/His/Ile/Lys/Leu/Met/Asn/Pro/Gln/Thr/Val/Trp nas razões molares de 20/26/26/13/1/1/1/1/1/1/1/1/1/1/1/1/1/1/1/1, respectivamente.

H3-D6
GTC TAT TAT TGT GCT CGC XXX XXX XXX XXX XXX XXX GST WTK GAC TAC TGG GGT CAA GGA (SEQ ID NO:71)
H3-D7
GTC TAT TAT TGT GCT CGC XXX XXX XXX XXX XXX XXX XXX GST WTK GAC TAC TGG GGT CAA GGA (SEQ ID NO:72)
H3-D8
GTC TAT TAT TGT GCT CGC XXX XXX XXX XXX XXX XXX XXX XXX GST WTK GAC TAC TGG GGT CAA GGA (SEQ ID NO:73)
H3-D9
GTC TAT TAT TGT GCT CGC XXX XXX XXX XXX XXX XXX XXX XXX XXX GST WTK GAC TAC TGG GGT CAA GGA (SEQ ID NO:74)
H3-D10
GTC TAT TAT TGT GCT CGC XXX XXX XXX XXX XXX XXX XXX XXX XXX XXX GST WTK GAC TAC TGG GGT CAA GGA (SEQ ID NO:75)
H3-D11
GTC TAT TAT TGT GCT CGC XXX XXX XXX XXX XXX XXX XXX XXX XXX XXX XXX GST WTK GAC TAC TGG GGT CAA GGA (SEQ ID NO:76)
H3-D12
GTC TAT TAT TGT GCT CGC XXX XXX XXX XXX XXX XXX XXX XXX XXX XXX XXX XXX GST WTK GAC TAC TGG GGT CAA GGA (SEQ ID NO:77)
H3-D13
GTC TAT TAT TGT GCT CGC XXX XXX XXX XXX XXX XXX XXX XXX XXX XXX XXX XXX XXX GST WTK GAC TAC TGG GGT CAA GGA (SEQ ID NO:78)
H3-D14
GTC TAT TAT TGT GCT CGC XXX XXX XXX XXX XXX XXX XXX XXX XXX XXX XXX XXX XXX XXX GST WTK GAC TAC TGG GGT CAA GGA (SEQ ID NO:79)
H3-D15
GTC TAT TAT TGT GCT CGC XXX XXX XXX XXX XXX XXX XXX XXX XXX XXX XXX XXX XXX XXX XXX GST WTK GAC TAC TGG GGT CAA GGA (SEQ ID NO:80)
H3-D16
GTC TAT TAT TGT GCT CGC XXX XXX XXX XXX XXX XXX XXX XXX XXX XXX XXX XXX XXX XXX XXX GST WTK GAC TAC TGG GGT CAA GGA (SEQ ID NO:81)
H3-D17
GTC TAT TAT TGT GCT CGC XXX XXX XXX XXX XXX XXX XXX XXX XXX XXX XXX XXX XXX XXX XXX XXX GST WTK GAC TAC TGG GGT CAA GGA (SEQ ID NO:82)

Fig. 10

Número de ligantes específicos observados por fago ELISA. (clones únicos / ligantes específicos)

	Biblioteca
	YSGR-A-D
Ligantes de HER-2 Humano	106/240
Ligantes de DR5 Humano	18/144

Fig. 11A

Clones ligantes de HER2

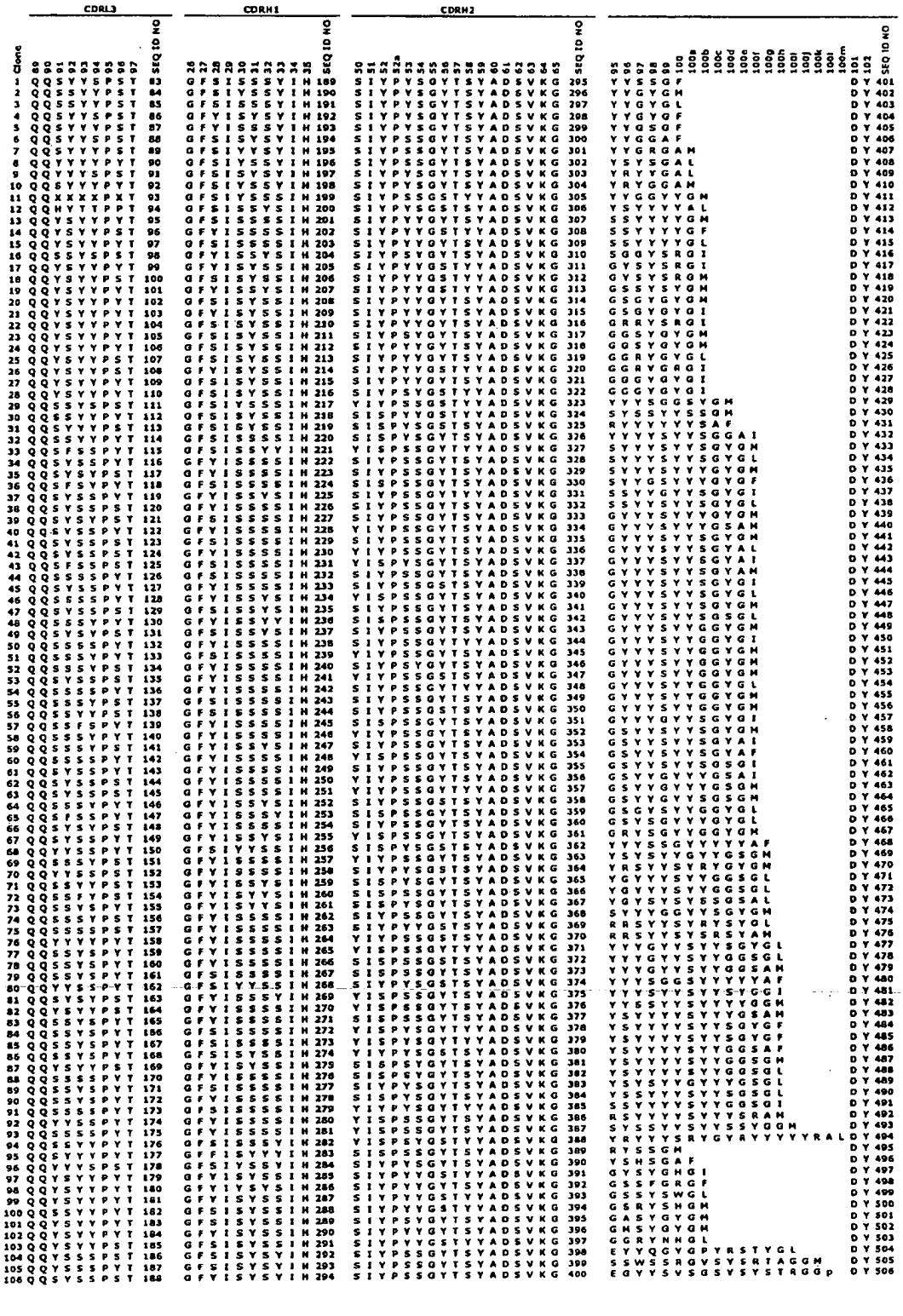


Fig. 11B

ELISA de reconhecimento de afinidade			Se liga com <100nM afinidade	0,25 a 2	2 a 10 Especialidade do ELISA						Afinidade de ligação de Fab-fago	
Com 100nM De HER2	Sem HER2	Razão	VEGF Humano	HER2 Humano	DR5 humano	Insulina humana	Neutravidin	Hormônio de crescimento humano	IGF-1 Humano	Albumina de soro bovino	IC50 (nM)	Erro +/-
0.20	1.80	0.11	0.10	4.40	-0.07	-0.05	0.07	0.04	0.07	-0.02		
0.18	1.49	0.12	0.15	3.74	0.01	0.04	0.13	0.12	0.19	-0.02	6.34	1.03
0.17	1.81	0.09	0.39	3.89	-0.02	-0.01	0.11	0.08	0.16	-0.03		
0.28	2.53	0.11	0.24	5.76	0.02	0.10	0.21	0.23	0.39	0.03		
0.14	2.58	0.05	0.14	4.23	-0.04	0.01	0.08	0.08	0.17	-0.04	1.58	0.07
0.27	2.30	0.12	0.21	4.04	-0.03	0.01	0.11	0.11	0.18	-0.02		
0.38	2.54	0.15	0.25	4.35	0.05	0.25	0.19	0.30	0.40	0.01		
0.49	3.16	0.15	0.21	3.56	0.02	0.06	0.16	0.14	0.23	-0.01	2.38	0.13
0.49	2.88	0.17	0.41	5.10	0.10	3.27	0.28	0.84	1.00	0.05		
0.39	3.12	0.13	0.27	4.57	0.03	0.12	0.20	0.28	0.36	0.00		
N/D	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D		
N/D	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D		
2.55	2.60	0.98	0.19	4.40	0.01	0.15	0.15	0.29	0.34	0.04		
2.07	2.00	1.03	0.28	3.64	0.25	0.14	0.15	0.30	0.41	0.06		
1.87	2.00	0.94	0.20	4.90	0.19	0.12	0.14	0.27	0.33	0.00		
2.03	2.47	0.83	0.12	3.40	0.02	0.00	0.07	0.11	0.19	-0.01		
2.94	3.84	0.77	0.38	5.76	0.12	0.48	0.24	0.70	0.87	0.09		
2.99	3.42	0.88	0.28	5.76	0.06	0.24	0.17	0.47	0.52	0.05		
2.82	2.95	0.95	0.18	4.16	-0.01	0.04	0.10	0.14	0.23	0.01		
3.03	3.80	0.80	0.23	3.73	0.05	0.12	0.14	3.25	0.41	0.03		
2.79	3.17	0.88	0.22	5.76	0.03	0.11	0.15	0.39	0.40	0.08		
3.36	3.30	1.02	3.00	3.62	2.40	4.33	2.27	1.77	3.88	1.18		
2.73	2.93	0.93	0.18	5.76	-0.01	0.06	0.10	2.24	0.30	0.03		
3.33	3.65	0.91	0.19	4.19	0.02	0.14	0.15	3.48	0.37	0.06		
3.03	3.23	0.94	0.23	4.20	0.05	0.32	0.20	0.43	0.46	0.02		
3.43	3.18	1.07	0.95	3.60	0.41	2.01	0.63	2.04	1.78	0.27		
3.26	3.58	0.91	0.17	3.71	-0.03	0.02	0.11	0.21	0.23	-0.01		
1.95	2.09	0.94	0.17	3.91	-0.07	-0.02	0.10	0.09	0.18	-0.01		
N/D	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D		
N/D	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D		
1.73	2.20	0.80	0.24	3.86	0.01	0.16	0.20	0.34	0.48	0.01		
0.41	2.28	0.21	0.21	5.76	0.00	0.08	0.15	0.13	0.25	0.00	3.12	0.37
0.10	2.39	0.07	0.20	4.26	-0.02	0.03	0.16	0.11	0.17	-0.01		
0.30	2.39	0.16	0.20	3.72	0.00	0.03	0.14	0.20	0.23	-0.01	1.61	0.33
0.34	1.59	0.25	0.23	4.13	0.00	0.05	0.17	0.17	0.27	0.01		
0.27	2.31	0.15	0.18	3.80	-0.03	0.03	0.14	0.15	0.19	0.00		
0.66	2.93	0.25	0.18	5.76	-0.01	0.02	0.10	0.12	0.20	0.01	2.44	0.24
0.71	2.65	0.29	0.20	3.86	-0.02	0.03	0.12	0.18	0.18	0.00		
0.44	2.89	0.18	0.14	3.82	-0.04	-0.01	0.09	0.11	0.18	-0.03	2.34	0.20
0.23	2.78	0.11	0.22	4.00	-0.02	0.00	0.14	0.15	0.21	-0.01		
0.27	2.63	0.13	0.20	5.76	-0.04	0.52	0.09	0.10	0.14	-0.03		
0.11	2.29	0.08	0.16	4.35	-0.02	0.01	0.12	0.14	0.18	0.03	0.32	0.01
0.30	2.61	0.14	0.16	4.16	-0.01	0.02	0.12	0.13	0.21	-0.03		
0.18	1.93	0.13	0.11	5.76	0.16	0.00	0.09	0.09	0.18	-0.01	2.41	0.22
0.27	2.60	0.14	0.19	5.76	-0.02	-0.01	0.11	0.12	0.17	-0.02	2.78	0.26
0.30	2.00	0.16	0.17	3.31	-0.03	-0.01	0.11	0.10	0.18	-0.02	3.46	0.40
0.32	2.46	0.16	0.32	4.30	0.01	0.02	0.11	0.12	0.19	-0.01		
0.34	1.90	0.21	0.14	3.74	-0.03	0.02	0.10	0.10	0.15	-0.01	4.97	0.37
0.50	2.92	0.20	0.15	5.76	-0.03	0.03	0.11	0.12	0.15	0.00	1.67	0.28
0.37	2.93	0.15	0.17	5.76	0.40	0.65	0.12	0.12	0.21	0.01		
0.62	2.78	0.25	0.12	4.45	-0.05	-0.02	0.10	0.12	0.15	0.00	3.70	0.28
0.58	2.58	0.25	0.22	4.51	0.04	0.11	0.21	0.21	0.34	0.04		
0.35	2.40	0.18	0.16	5.76	-0.04	0.01	0.13	0.10	0.16	-0.01	3.42	0.15
0.15	2.21	0.10	0.52	5.76	-0.03	0.03	0.15	0.14	0.17	0.01		
0.32	2.78	0.14	0.16	3.94	-0.04	0.22	0.10	0.06	0.14	-0.04		
0.38	2.51	0.16	0.29	4.04	-0.02	0.03	0.15	0.11	0.20	-0.01		
0.34	2.98	0.14	0.15	3.71	-0.05	0.02	0.11	0.08	0.21	-0.01		
0.35	2.67	0.16	0.15	5.76	-0.06	0.05	0.13	0.09	0.13	-0.02	1.39	0.09
0.25	2.46	0.13	0.14	3.92	-0.05	0.05	0.14	0.07	0.14	-0.03	1.69	0.13
0.34	2.56	0.16	1.04	4.39	-0.02	0.05	0.12	0.12	0.21	0.00		
0.64	3.12	0.23	0.11	5.76	-0.03	0.49	0.11	0.12	0.15	0.00		
0.64	2.96	0.24	0.17	4.17	0.00	0.07	0.17	0.23	0.38	0.04		
0.65	2.97	0.24	0.18	3.76	0.00	0.07	0.17	0.24	0.28	0.04		
0.53	2.10	0.28	0.12	5.10	-0.02	0.01	0.10	0.09	0.17	-0.01		
0.64	2.65	0.27	0.17	3.89	-0.04	0.00	0.11	0.10	0.19	-0.01		
0.31	1.85	0.20	0.44	4.04	-0.04	0.03	0.11	0.12	0.18	-0.01		
0.38	2.03	0.22	0.13	5.76	-0.03	-0.01	0.11	0.11	0.17	-0.01	3.15	0.16
1.99	2.28	0.88	0.36	4.34	-0.01	0.03	0.12	0.15	0.26	0.00		
0.63	2.67	0.24	0.15	5.76	-0.01	0.02	0.13	0.11	0.18	-0.01		
0.08	1.21	0.12	0.58	5.76	0.32	1.39	0.45	1.13	3.00	0.17		
0.34	2.67	0.13	0.16	5.48	-0.02	0.03	0.12	0.18	0.24	0.00	2.25	0.18
0.41	2.91	0.17	0.18	5.76	-0.03	0.06	0.12	0.13	0.19	0.00		
0.78	2.83	0.30	0.15	5.76	0.06	0.08	0.12	0.15	0.26	0.00		
0.61	2.88	0.23	0.13	5.76	-0.02	0.02	0.10	0.11	0.21	-0.03		
0.20	1.93	0.11	3.18	4.90	2.74	5.79	3.13	4.99	5.86	1.57		
0.36	2.38	0.18	0.55	3.45	0.31	0.86	0.41	1.19	3.84	0.12		
0.21	2.04	0.14	0.45	5.76	-0.01	0.04	0.14	0.15	0.28	0.03		
0.22	2.35	0.12	0.21	3.68	0.01	0.05	0.18	0.14	0.24	0.01		
0.23	2.79	0.11	0.18	4.35	0.00	0.03	0.15	0.11	0.24	0.00	0.38	0.05
1.57	1.98	0.80	0.20	3.46	0.00	0.06	0.17	0.15	0.29	0.01		
0.21	1.25	0.22	0.19	5.76	-0.02	0.02	0.15	0.11	0.18	0.00		
3.14	3.57	0.88	0.27	3.67	0.05	0.27	0.19	0.25	0.38	0.05		
0.13	2.71	0.08	0.16	4.57	0.25	0.35	0.16	0.18	0.30	0.02		
0.13	2.15	0.10	0.35	4.06	0.44	0.10	0.17	0.22	0.33	0.03		
0.29	2.66	0.14	0.12	5.76	-0.05	0.34	0.12	0.16	0.23	0.00		
0.28	2.91	0.12	0.15	5.76	0.03	0.15	0.17	0.19	0.33	0.02	0.41	0.02
3.48	3.38	1.03	0.18	5.76	0.07	0.15	0.16	0.27	0.35	0.02		
0.77	3.33	0.23	0.20	5.76	0.04	0.10	0.18	0.22	0.31	0.04		
0.39	1.93	0.20	0.20	3.57	0.07	0.16	0.20	0.29	0.43	0.07		
0.08	2.47	0.03	0.47	5.76	0.08	0.07	0.14	0.17	0.35	0.02		
0.27	1.89	0.14	0.18	4.04	0.10	0.11	0.16	0.23	0.30	0.03		
0.09	2.52	0.04	1.37	5.76	0.63	2.41	0.88	5.86	5.86	0.44		
0.20	1.63	0.12	0.12	3.99	0.08	0.01	0.09	0.11	0.17	0.00	5.44	0.22
N/D	N/D	N/D	3.53	3.37	5.79	3.42	3.91	3.34	3.57	3.34		
0.37	2.35	0.16	0.23	4.13	-0.14	0.13	0.06	0.06	0.18	0.01	2.54	0.21
0.24	2.24	0.11	0.08	5.92	-0.08	0.14	0.07	0.07	0.19	0.02	2.25	0.24
2.59	3.02	0.86	0.18	5.92	-0.11	0.17	0.12	0.16	0.33	0.05		
1.55	1.83	0.85	0.30	4.04	-0.05	0.51	0.16	0.40	0.65	0.05		
2.33	2.65	0.88	0.19	4.30	-0.08	0.21	0.18	0.19	0.32	0.07		
2.24	2.76	0.81	0.16	4.06	-0.13	0.22	0.06	0.10	0.26	0.03		
2.30	2.67	0.86	0.14	4.12	-0.15	0.07	0.03	0.07	0.10	0.01		
1.62	1.91	0.85	0.18	5.24	-0.10	0.21	0.12	0.18	0.29	0.05		
2.58	3.19	0.81	0.20	3.72	-0.07	0.27	0.10	0.16	0.33	0.04		
2.01	3.02	0.67	0.08	5.92	-0.14	0.06	0.04	0.04	0.10	0.00		
1.61	1.70	0.95	0.13	5.92	-0.13	0.10	0.05	0.08	0.13	0.03		
1.18	1.37	0.89	0.06	4.37	-0.15	0.06	0.05	0.05	0.12	0.01		

Fig. 12

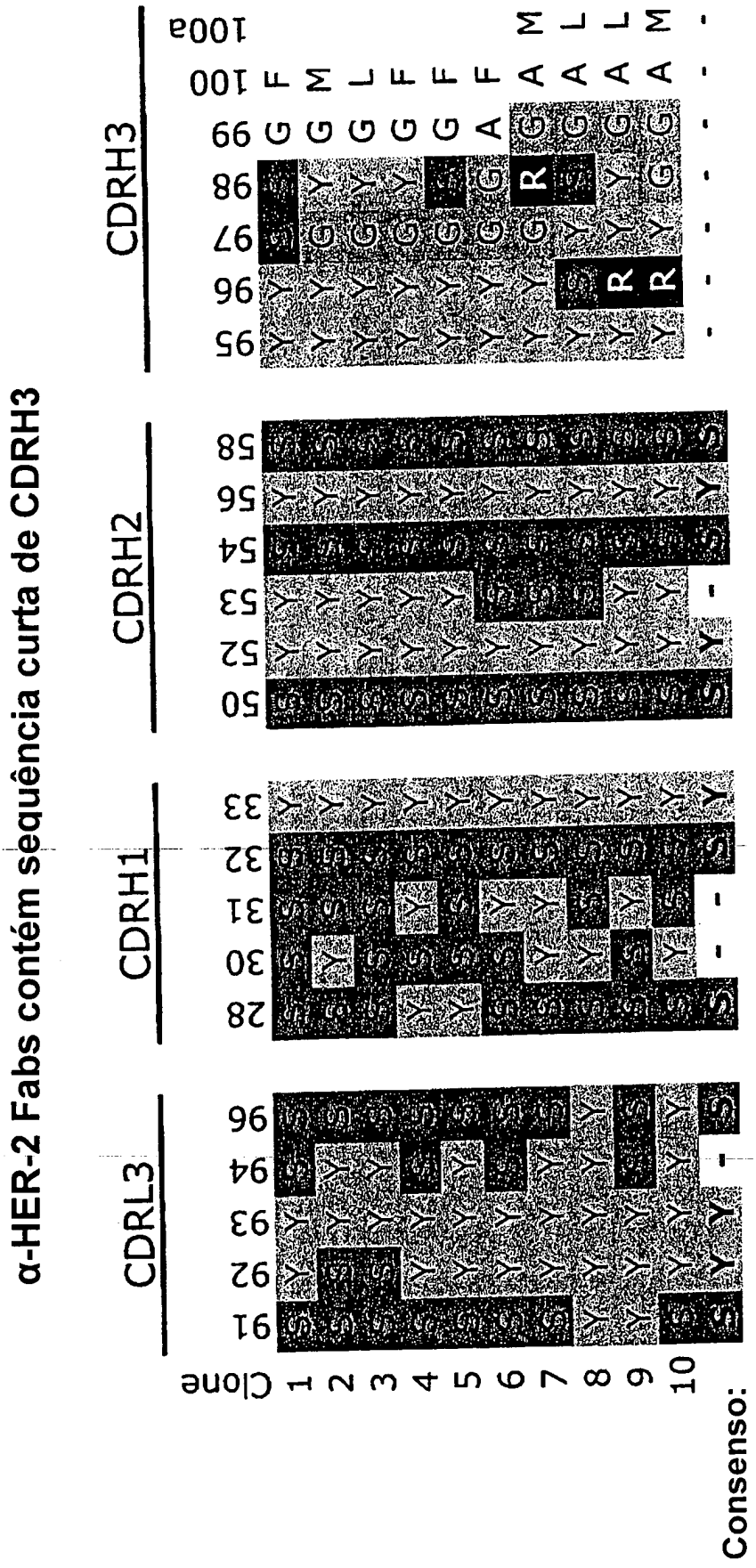
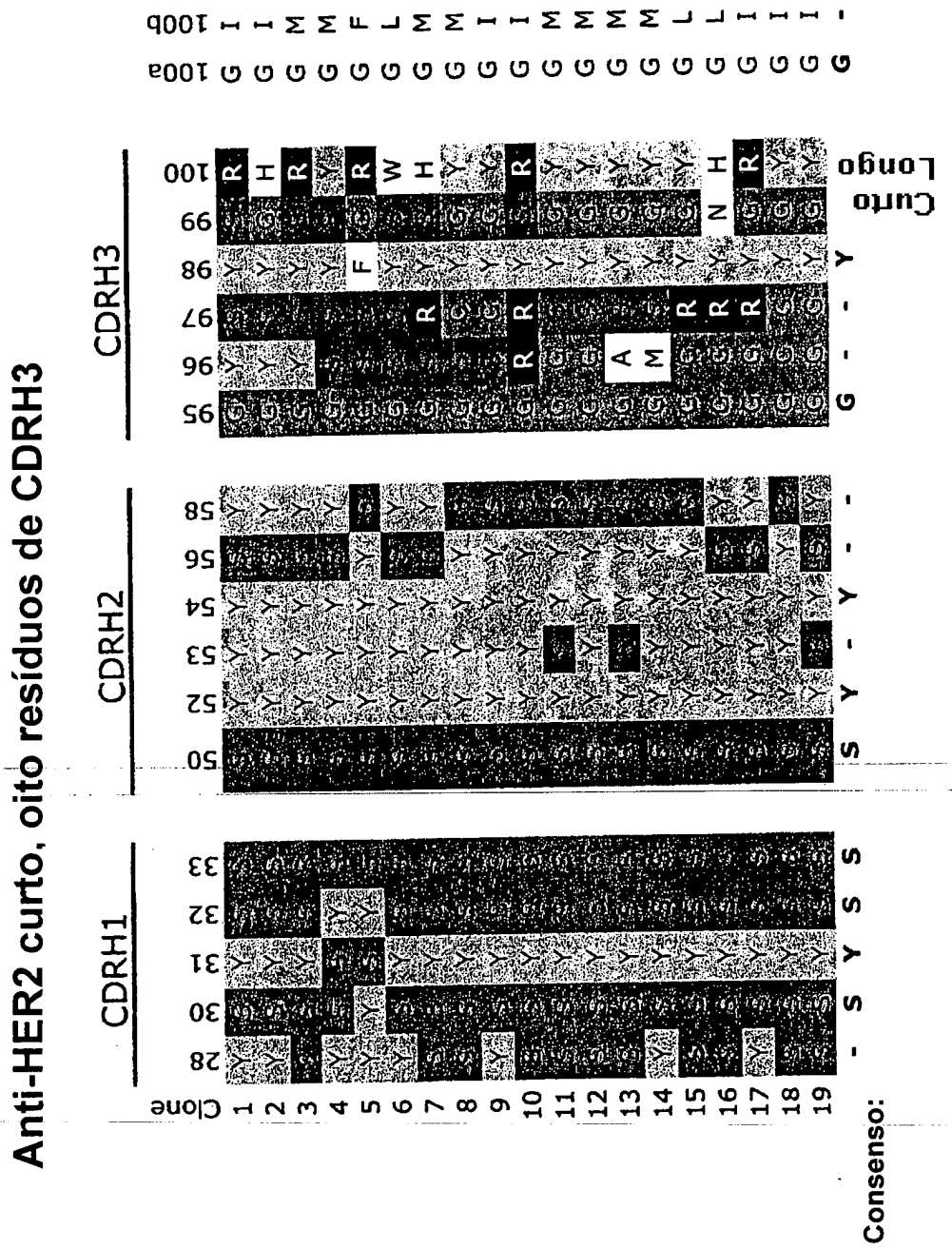

α-HER-2 Fabs contém sequência curta de CDRH3
CDRL3
CDRH1
CDRH2
CDRH3
Clone
Consenso:

Fig. 13


Anti-HER2 curto, oito resíduos de CDRH3
CDRH1
CDRH2
CDRH3
Clone
Curto
Longo
Consenso:

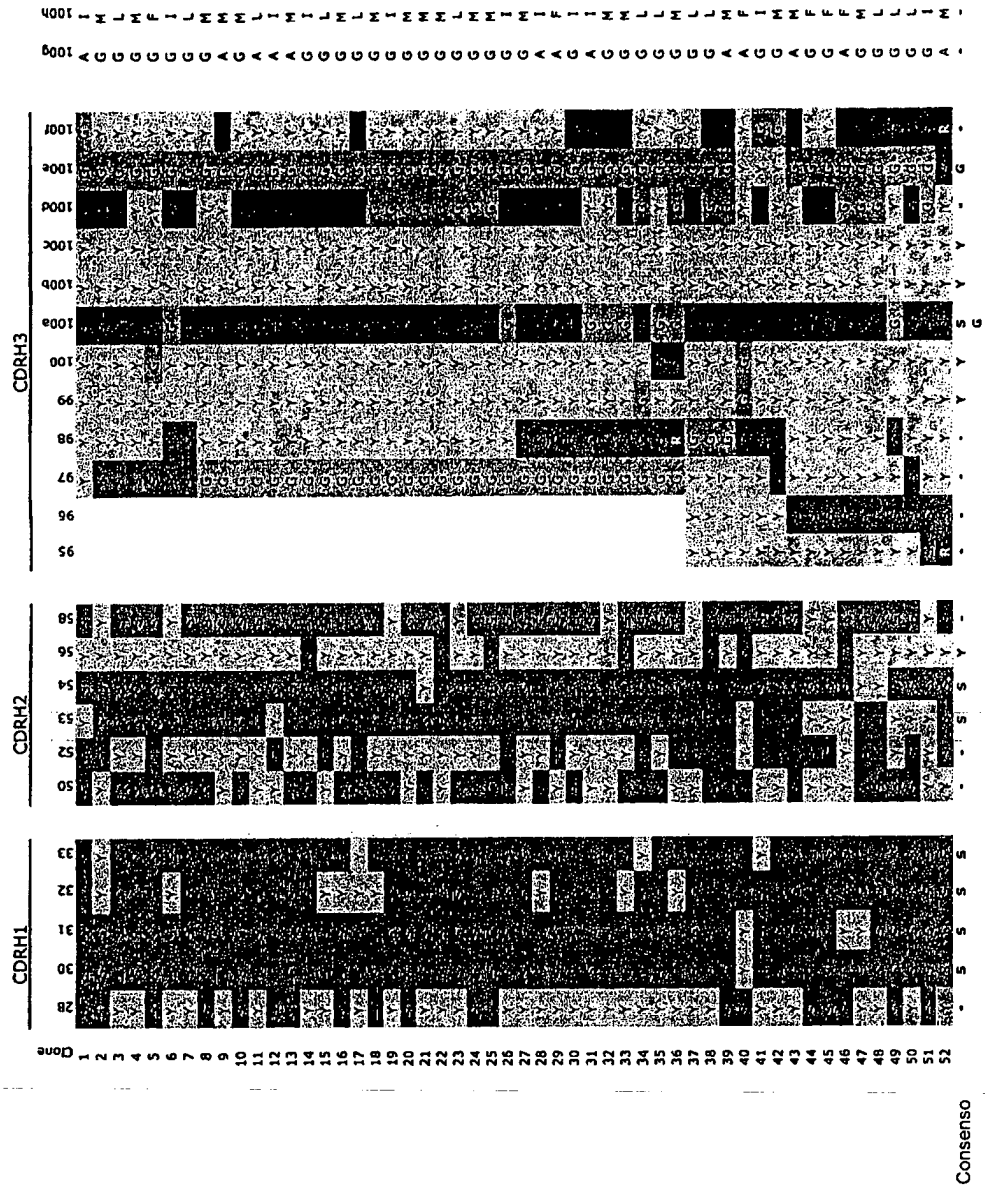

Anti-HER2 YSG Comprimento médio
CDRH1
CDRH2
CDRH3
Clone
Consenso

Fig. 14

Fig. 15

Clones ligantes de DRS

| | CDRL3 | | | | | | | | | | | CDRH1 | | | | | | | | | | CDRH2 | | | | | | | | | | | | | | | | | CDRH3 | | | | | | | | | | | | | | | | |

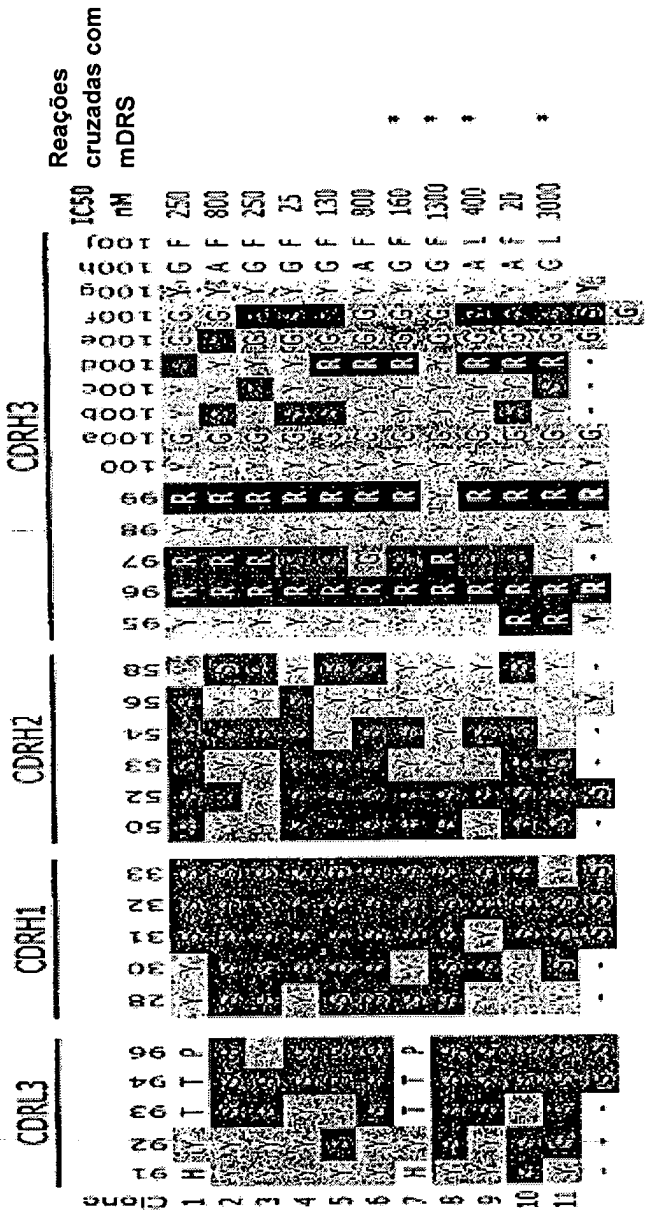
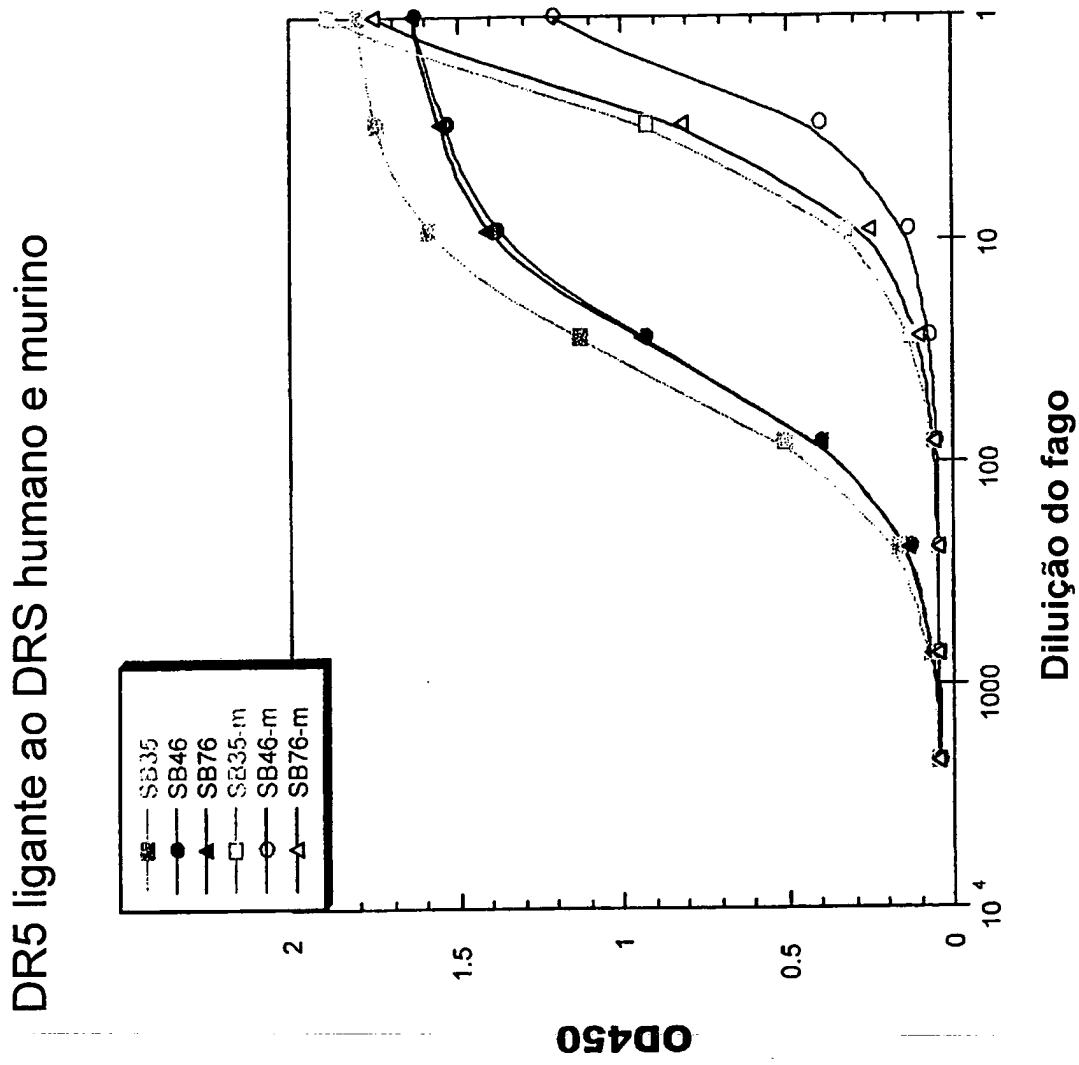

Reações cruzadas com mDRS
IC50 nM
CDRL3
CDRH1
CDRH2
CDRH3
Clone

Fig. 16

Fig. 17


DR5 ligante ao DRS humano e murino
SB35
SB46
SB76
SB35-m
SB46-m
SB76-m
OD450
2
1.5
1
0.5
0
10 4
1000
100
10
1
Diluição do fago

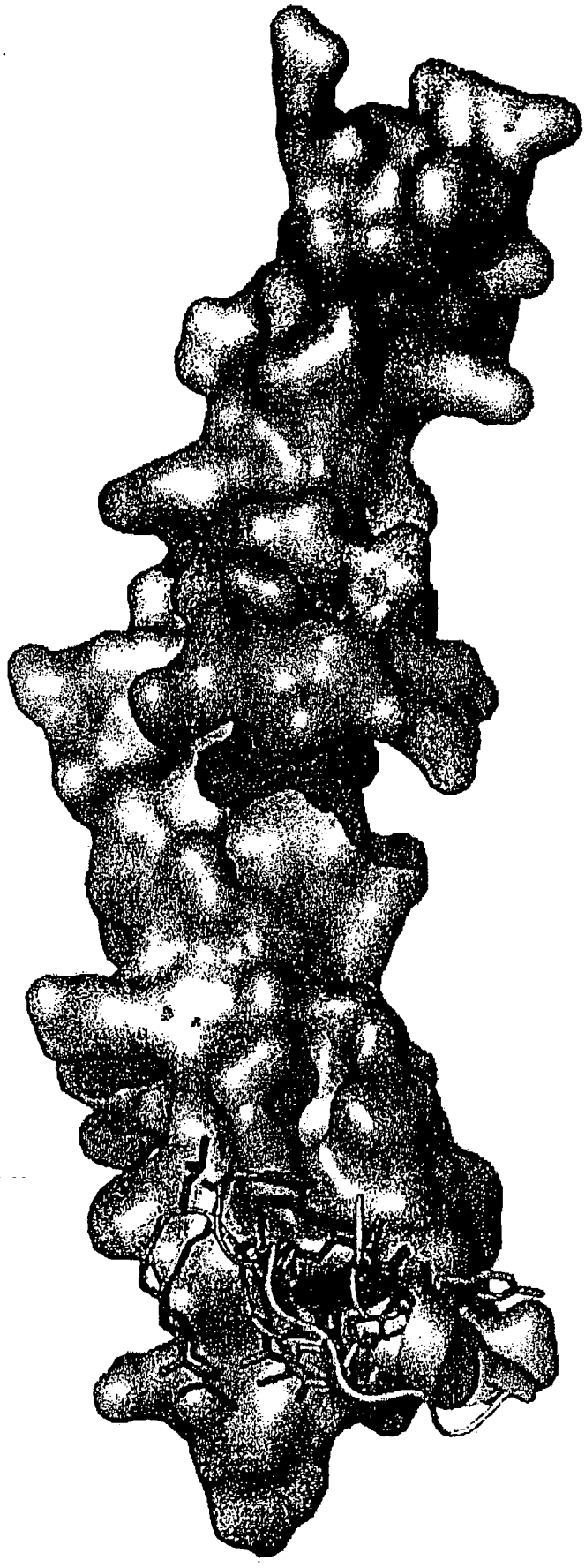


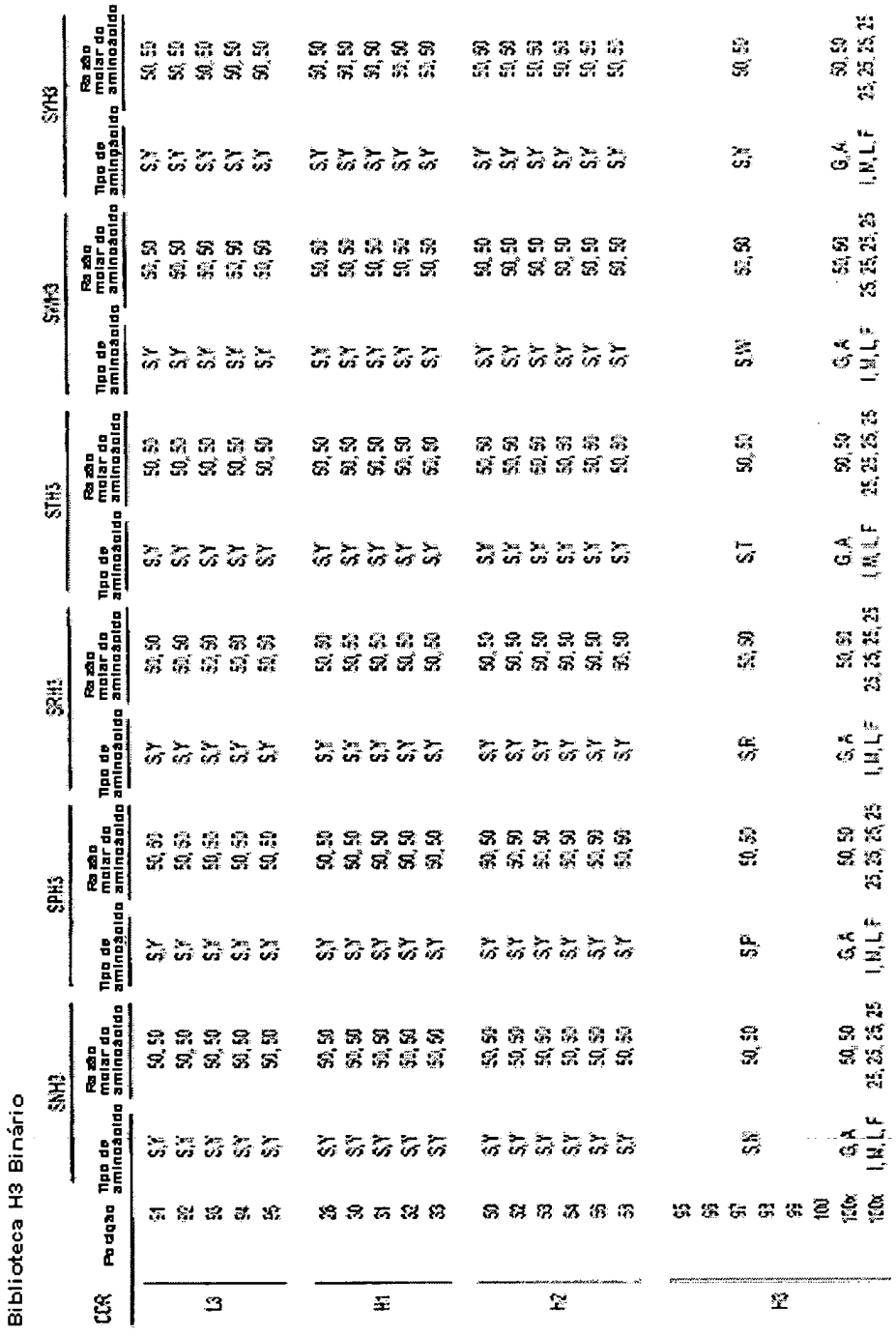
Fig. 18

Fig. 19A

Biblioteca H3 binária

		SAH3		SCH3		SFH3		SGH3		SIH3		SLH3	
CDR	Posição	Tipo de aminoácido	Razão molar de aminoácido	Tipo de aminoácido	Razão molar de aminoácido	Tipo de aminoácido	Razão molar de aminoácido	Tipo de aminoácido	Razão molar de aminoácido	Tipo de aminoácido	Razão molar de aminoácido	Tipo de aminoácido	Razão molar de aminoácido
L3	91	S,Y	50, 50	S,Y	50, 50	S,Y	50, 50	S,Y	50, 50	S,Y	50, 50	S,Y	50, 50
	92	S,Y	50, 50	S,Y	50, 50	S,Y	50, 50	S,Y	50, 50	S,Y	50, 50	S,Y	50, 50
	93	S,Y	50, 50	S,Y	50, 50	S,Y	50, 50	S,Y	50, 50	S,Y	50, 50	S,Y	50, 50
	94	S,Y	50, 50	S,Y	50, 50	S,Y	50, 50	S,Y	50, 50	S,Y	50, 50	S,Y	50, 50
	96	S,Y	50, 50	S,Y	50, 50	S,Y	50, 50	S,Y	50, 50	S,Y	50, 50	S,Y	50, 50
H1	28	S,Y	50, 50	S,Y	50, 50	S,Y	50, 50	S,Y	50, 50	S,Y	50, 50	S,Y	50, 50
	30	S,Y	50, 50	S,Y	50, 50	S,Y	50, 50	S,Y	50, 50	S,Y	50, 50	S,Y	50, 50
	31	S,Y	50, 50	S,Y	50, 50	S,Y	50, 50	S,Y	50, 50	S,Y	50, 50	S,Y	50, 50
	32	S,Y	50, 50	S,Y	50, 50	S,Y	50, 50	S,Y	50, 50	S,Y	50, 50	S,Y	50, 50
	33	S,Y	50, 50	S,Y	50, 50	S,Y	50, 50	S,Y	50, 50	S,Y	50, 50	S,Y	50, 50
H2	50	S,Y	50, 50	S,Y	50, 50	S,Y	50, 50	S,Y	50, 50	S,Y	50, 50	S,Y	50, 50
	52	S,Y	50, 50	S,Y	50, 50	S,Y	50, 50	S,Y	50, 50	S,Y	50, 50	S,Y	50, 50
	53	S,Y	50, 50	S,Y	50, 50	S,Y	50, 50	S,Y	50, 50	S,Y	50, 50	S,Y	50, 50
	54	S,Y	50, 50	S,Y	50, 50	S,Y	50, 50	S,Y	50, 50	S,Y	50, 50	S,Y	50, 50
	56	S,Y	50, 50	S,Y	50, 50	S,Y	50, 50	S,Y	50, 50	S,Y	50, 50	S,Y	50, 50
	58	S,Y	50, 50	S,Y	50, 50	S,Y	50, 50	S,Y	50, 50	S,Y	50, 50	S,Y	50, 50
H3	95												
	96												
	97	S,A	50, 50	S,C	50, 50	S,F	50, 50	S,G	50, 50	S,I	50, 50	S,L	50, 50
	98												
	99												
	100												
	100x	G,A	50, 50	G,A	50, 50	G,A	50, 50	G,A	50, 50	G,A	50, 50	G,A	50, 50
	100x	I, M, L, F	25, 25, 25, 25	I, M, L, F	25, 25, 25, 25	I, M, L, F	25, 25, 25, 25	I, M, L, F	25, 25, 25, 25	I, M, L, F	25, 25, 25, 25	I, M, L, F	25, 25, 25, 25

Fig. 19B



Biblioteca H3 Binário

CDR	Posição	SNH3		SPH3		SPH3		STH3		SMH3		SYH3	
		Tipo de aminoácido	Razão molar do aminoácido	Tipo de aminoácido	Razão molar do aminoácido	Tipo de aminoácido	Razão molar do aminoácido	Tipo de aminoácido	Razão molar do aminoácido	Tipo de aminoácido	Razão molar do aminoácido	Tipo de aminoácido	Razão molar do aminoácido
L3	91	S,Y	50, 50	S,Y	50, 50	S,Y	50, 50	S,Y	50, 50	S,Y	50, 50	S,Y	50, 50
	92	S,Y	50, 50	S,Y	50, 50	S,Y	50, 50	S,Y	50, 50	S,Y	50, 50	S,Y	50, 50
	93	S,Y	50, 50	S,Y	50, 50	S,Y	50, 50	S,Y	50, 50	S,Y	50, 50	S,Y	50, 50
	94	S,Y	50, 50	S,Y	50, 50	S,Y	50, 50	S,Y	50, 50	S,Y	50, 50	S,Y	50, 50
	95	S,Y	50, 50	S,Y	50, 50	S,Y	50, 50	S,Y	50, 50	S,Y	50, 50	S,Y	50, 50
H1	28	S,Y	50, 50	S,Y	50, 50	S,Y	50, 50	S,Y	50, 50	S,Y	50, 50	S,Y	50, 50
	30	S,Y	50, 50	S,Y	50, 50	S,Y	50, 50	S,Y	50, 50	S,Y	50, 50	S,Y	50, 50
	31	S,Y	50, 50	S,Y	50, 50	S,Y	50, 50	S,Y	50, 50	S,Y	50, 50	S,Y	50, 50
	32	S,Y	50, 50	S,Y	50, 50	S,Y	50, 50	S,Y	50, 50	S,Y	50, 50	S,Y	50, 50
	33	S,Y	50, 50	S,Y	50, 50	S,Y	50, 50	S,Y	50, 50	S,Y	50, 50	S,Y	50, 50
H2	50	S,Y	50, 50	S,Y	50, 50	S,Y	50, 50	S,Y	50, 50	S,Y	50, 50	S,Y	50, 50
	52	S,Y	50, 50	S,Y	50, 50	S,Y	50, 50	S,Y	50, 50	S,Y	50, 50	S,Y	50, 50
	53	S,Y	50, 50	S,Y	50, 50	S,Y	50, 50	S,Y	50, 50	S,Y	50, 50	S,Y	50, 50
	54	S,Y	50, 50	S,Y	50, 50	S,Y	50, 50	S,Y	50, 50	S,Y	50, 50	S,Y	50, 50
	55	S,Y	50, 50	S,Y	50, 50	S,Y	50, 50	S,Y	50, 50	S,Y	50, 50	S,Y	50, 50
	56	S,Y	50, 50	S,Y	50, 50	S,Y	50, 50	S,Y	50, 50	S,Y	50, 50	S,Y	50, 50
H3	95												
	96												
	97	S,N	50, 50	S,P	50, 50	S,R	50, 50	S,T	50, 50	S,W	50, 50	S,Y	50, 50
	98												
	99												
	100												
	100a	G,A	50, 50	G,A	50, 50	G,A	50, 50	G,A	50, 50	G,A	50, 50	G,A	50, 50
	100c	I,M,L,F	25, 25, 25, 25	I,M,L,F	25, 25, 25, 25	I,M,L,F	25, 25, 25, 25	I,M,L,F	25, 25, 25, 25	I,M,L,F	25, 25, 25, 25	I,M,L,F	25, 25, 25, 25

Fig. 20A

Oligonucleotídeos mutagênicos utilizados na construção de bibliotecas SAH3, SCH3, SFH3, SGH3, SIH3, SLH3, SNH3, SPH3, SRH3, STH3, SWH3 E SYH3. Degeneração De DNA equimolar são representadas no código IUB (W=A/T, K=G/T, M=A/C, S=G/C, Y=C/T, R=A/G).

H1
GCA GCT TCT GGC TTC TMT ATT TMT TMT TMT TMT ATA CAC TGG GTG CGT (SEQ ID NO: 618)
H2
CTG GAA TGG GTT GCA TMT ATT TMT CCA TMT TMT GGT TMT ACT TMT TAT GCC GAT AGC GTC (SEQ ID NO: 619)
L3
ACT TAT TAC TGT CAG CAA TMT TMT TMT TMT CCA TMT ACG TTC GGA CAG GGT ACC (SEQ ID NO: 620)
H3-SA4
GTC TAT TAT TGT GCT CGC KCT KCT KCT KCT GST WTK GAC TAC TGG GGT CAA GGA (SEQ ID NO: 621)
H3-SA5
GTC TAT TAT TGT GCT CGC KCT KCT KCT KCT KCT GST WTK GAC TAC TGG GGT CAA GGA (SEQ ID NO: 622)
H3-SA6
GTC TAT TAT TGT GCT CGC KCT KCT KCT KCT KCT KCT GST WTK GAC TAC TGG GGT CAA GGA (SEQ ID NO: 623)
H3-SA7
GTC TAT TAT TGT GCT CGC KCT KCT KCT KCT KCT KCT KCT GST WTK GAC TAC TGG GGT CAA GGA (SEQ ID NO: 624)
H3-SA8
GTC TAT TAT TGT GCT CGC KCT KCT KCT KCT KCT KCT KCT KCT GST WTK GAC TAC TGG GGT CAA GGA (SEQ ID NO: 625)
H3-SA9
GTC TAT TAT TGT GCT CGC KCT KCT KCT KCT KCT KCT KCT KCT KCT GST WTK GAC TAC TGG GGT CAA GGA (SEQ ID NO: 626)
H3-sA10
GTC TAT TAT TGT GCT CGC KCT KCT KCT KCT KCT KCT KCT KCT KCT KCT GST WTK GAC TAC TGG GGT CAA GGA (SEQ ID NO: 627)
H3-SA11
GTC TAT TAT TGT GCT CGC KCT KCT KCT KCT KCT KCT KCT KCT KCT KCT KCT GST WTK GAC TAC TGG GGT CAA GGA (SEQ ID NO: 628)
H3-SA12
GTC TAT TAT TGT GCT CGC KCT KCT KCT KCT KCT KCT KCT KCT KCT KCT KCT KCT GST WTK GAC TAC TGG GGT CAA GGA (SEQ ID NO: 629)
H3-SA13
GTC TAT TAT TGT GCT CGC KCT KCT KCT KCT KCT KCT KCT KCT KCT KCT KCT KCT KCT GST WTK GAC TAC TGG GGT CAA GGA (SEQ ID NO: 630)
H3-SA14
GTC TAT TAT TGT GCT CGC KCT KCT KCT KCT KCT KCT KCT KCT KCT KCT KCT KCT KCT KCT GST WTK GAC TAC TGG GGT CAA GGA (SEQ ID NO: 631)
H3-SA15
GTC TAT TAT TGT GCT CGC KCT KCT KCT KCT KCT KCT KCT KCT KCT KCT KCT KCT KCT KCT KCT GST WTK GAC TAC TGG GGT CAA GGA (SEQ ID NO: 632)
H3-SA16
GTC TAT TAT TGT GCT CGC KCT KCT KCT KCT KCT KCT KCT KCT KCT KCT KCT KCT KCT KCT KCT KCT GST WTK GAC TAC TGG GGT CAA GGA (SEQ ID NO: 633)
H3-SA17
GTC TAT TAT TGT GCT CGC KCT KCT KCT KCT KCT KCT KCT KCT KCT KCT KCT KCT KCT KCT KCT KCT KCT GST WTK GAC TAC TGG GGT CAA GGA (SEQ ID NO: 634)

Fig. 20B

Oligonucleotídeos mutagênicos utilizados na construção de bibliotecas SCH3. Degeneração De DNA equimolar são representadas no código IUB (W=A/T, K=G/T, M=A/C, S=G/C, Y=C/T, R=A/G)

H3-SC4
GTC TAT TAT TGT GCT CGC TSC TSC TSC TSC GST WTK GAC TAC TGG GGT CAA GGA (SEQ ID NO: 635)
H3-SC5
GTC TAT TAT TGT GCT CGC TSC TSC TSC TSC TSC GST WTK GAC TAC TGG GGT CAA GGA (SEQ ID NO: 636)
H3-SC6
GTC TAT TAT TGT GCT CGC TSC TSC TSC TSC TSC TSC GST WTK GAC TAC TGG GGT CAA GGA (SEQ ID NO: 637)
H3-SC7
GTC TAT TAT TGT GCT CGC TSC TSC TSC TSC TSC TSC TSC GST WTK GAC TAC TGG GGT CAA GGA (SEQ ID NO: 638)
H3-SC8
GTC TAT TAT TGT GCT CGC TSC TSC TSC TSC TSC TSC TSC TSC GST WTK GAC TAC TGG GGT CAA GGA (SEQ ID NO: 639)
H3-SC9
GTC TAT TAT TGT GCT CGC TSC TSC TSC TSC TSC TSC TSC TSC TSC GST WTK GAC TAC TGG GGT CAA GGA (SEQ ID NO: 640)
H3-SC10
GTC TAT TAT TGT GCT CGC TSC TSC TSC TSC TSC TSC TSC TSC TSC TSC GST WTK GAC TAC TGG GGT CAA GGA (SEQ ID NO: 641)
H3-SC11
GTC TAT TAT TGT GCT CGC TSC TSC TSC TSC TSC TSC TSC TSC TSC TSC TSC GST WTK GAC TAC TGG GGT CAA GGA (SEQ ID NO: 642)
H3-SC12
GTC TAT TAT TGT GCT CGC TSC TSC TSC TSC TSC TSC TSC TSC TSC TSC TSC TSC GST WTK GAC TAC TGG GGT CAA GGA (SEQ ID NO: 643)
H3-SC13
GTC TAT TAT TGT GCT CGC TSC TSC TSC TSC TSC TSC TSC TSC TSC TSC TSC TSC TSC GST WTK GAC TAC TGG GGT CAA GGA (SEQ ID NO: 644)
H3-SC14
GTC TAT TAT TGT GCT CGC TSC TSC TSC TSC TSC TSC TSC TSC TSC TSC TSC TSC TSC TSC GST WTK GAC TAC TGG GGT CAA GGA (SEQ ID NO: 645)
H3-SC15
GTC TAT TAT TGT GCT CGC TSC TSC TSC TSC TSC TSC TSC TSC TSC TSC TSC TSC TSC TSC TSC GST WTK GAC TAC TGG GGT CAA GGA (SEQ ID NO: 646)
H3-SC16
GTC TAT TAT TGT GCT CGC TSC TSC TSC TSC TSC TSC TSC TSC TSC TSC TSC TSC TSC TSC TSC TSC GST WTK GAC TAC TGG GGT CAA GGA (SEQ ID NO: 647)
H3-SC17
GTC TAT TAT TGT GCT CGC TSC TSC TSC TSC TSC TSC TSC TSC TSC TSC TSC TSC TSC TSC TSC TSC TSC GST WTK GAC TAC TGG GGT CAA GGA (SEQ ID NO: 648)

Fig. 20C

Oligonucleotídeos mutagênicos utilizados na construção de bibliotecas SFH3. Degeneração De DNA equimolar são representadas no código IUB (W=A/T, K=G/T, M=A/C, S=G/C, Y=C/T, R=A/G)

H3-SF4
GTC TAT TAT TGT GCT CGC TYC TYC TYC TYC GST WTK GAC TAC TGG GGT CAA GGA (SEQ ID NO: 649)
H3-SF5
GTC TAT TAT TGT GCT CGC TYC TYC TYC TYC TYC GST WTK GAC TAC TGG GGT CAA GGA (SEQ ID NO: 650)
H3-SF6
GTC TAT TAT TGT GCT CGC TYC TYC TYC TYC TYC TYC GST WTK GAC TAC TGG GGT CAA GGA (SEQ ID NO: 651)
H3-SF7
GTC TAT TAT TGT GCT CGC TYC TYC TYC TYC TYC TYC TYC GST WTK GAC TAC TGG GGT CAA GGA (SEQ ID NO: 652)
H3-SF8
GTC TAT TAT TGT GCT CGC TYC TYC TYC TYC TYC TYC TYC TYC GST WTK GAC TAC TGG GGT CAA GGA (SEQ ID NO: 653)
H3-SF9
GTC TAT TAT TGT GCT CGC TYC TYC TYC TYC TYC TYC TYC TYC TYC GST WTK GAC TAC TGG GGT CAA GGA (SEQ ID NO: 654)
H3-SF10
GTC TAT TAT TGT GCT CGC TYC TYC TYC TYC TYC TYC TYC TYC TYC TYC GST WTK GAC TAC TGG GGT CAA GGA (SEQ ID NO: 655)
H3-SF11
GTC TAT TAT TGT GCT CGC TYC TYC TYC TYC TYC TYC TYC TYC TYC TYC TYC GST WTK GAC TAC TGG GGT CAA GGA (SEQ ID NO: 656)
H3-SF12
GTC TAT TAT TGT GCT CGC TYC TYC TYC TYC TYC TYC TYC TYC TYC TYC TYC TYC GST WTK GAC TAC TGG GGT CAA GGA (SEQ ID NO: 657)
H3-SF13
GTC TAT TAT TGT GCT CGC TYC TYC TYC TYC TYC TYC TYC TYC TYC TYC TYC TYC TYC GST WTK GAC TAC TGG GGT CAA GGA (SEQ ID NO: 658)
H3-SF14
GTC TAT TAT TGT GCT CGC TYC TYC TYC TYC TYC TYC TYC TYC TYC TYC TYC TYC TYC TYC GST WTK GAC TAC TGG GGT CAA GGA (SEQ ID NO: 659)
H3-SF15
GTC TAT TAT TGT GCT CGC TYC TYC TYC TYC TYC TYC TYC TYC TYC TYC TYC TYC TYC TYC TYC GST WTK GAC TAC TGG GGT CAA GGA (SEQ ID NO: 660)
H3-SF16
GTC TAT TAT TGT GCT CGC TYC TYC TYC TYC TYC TYC TYC TYC TYC TYC TYC TYC TYC TYC TYC TYC GST WTK GAC TAC TGG GGT CAA GGA (SEQ ID NO: 661)
H3-SF17
GTC TAT TAT TGT GCT CGC TYC TYC TYC TYC TYC TYC TYC TYC TYC TYC TYC TYC TYC TYC TYC TYC TYC GST WTK GAC TAC TGG GGT CAA GGA (SEQ ID NO: 662)

Fig. 20D

Oligonucleotídeos mutagênicos utilizados na construção de bibliotecas SGH3. Degeneração De DNA equimolar são representadas no código IUB (W=A/T, K=G/T, M=A/C, S=G/C, Y=C/T, R=A/G)

H3-SG4
GTC TAT TAT TGT GCT CGC RGC RGC RGC RGC GST WTK GAC TAC TGG GGT CAA GGA (SEQ ID NO: 663)
H3-SG5
GTC TAT TAT TGT GCT CGC RGC RGC RGC RGC RGC GST WTK GAC TAC TGG GGT CAA GGA (SEQ ID NO: 664)
H3-SG6
GTC TAT TAT TGT GCT CGC RGC RGC RGC RGC RGC RGC GST WTK GAC TAC TGG GGT CAA GGA (SEQ ID NO: 665)
H3-SG7
GTC TAT TAT TGT GCT CGC RGC RGC RGC RGC RGC RGC RGC GST WTK GAC TAC TGG GGT CAA GGA (SEQ ID NO: 666)
H3-SG8
GTC TAT TAT TGT GCT CGC RGC RGC RGC RGC RGC RGC RGC RGC GST WTK GAC TAC TGG GGT CAA GGA (SEQ ID NO: 667)
H3-SG9
GTC TAT TAT TGT GCT CGC RGC RGC RGC RGC RGC RGC RGC RGC RGC GST WTK GAC TAC TGG GGT CAA GGA (SEQ ID NO: 668)
H3-SG10
GTC TAT TAT TGT GCT CGC RGC RGC RGC RGC RGC RGC RGC RGC RGC RGC GST WTK GAC TAC TGG GGT CAA GGA (SEQ ID NO: 669)
H3-SG11
GTC TAT TAT TGT GCT CGC RGC RGC RGC RGC RGC RGC RGC RGC RGC RGC RGC GST WTK GAC TAC TGG GGT CAA GGA (SEQ ID NO: 670)
H3-SG12
GTC TAT TAT TGT GCT CGC RGC RGC RGC RGC RGC RGC RGC RGC RGC RGC RGC RGC GST WTK GAC TAC TGG GGT CAA GGA (SEQ ID NO: 671)
H3-SG13
GTC TAT TAT TGT GCT CGC RGC RGC RGC RGC RGC RGC RGC RGC RGC RGC RGC RGC RGC GST WTK GAC TAC TGG GGT CAA GGA (SEQ ID NO: 672)
H3-SG14
GTC TAT TAT TGT GCT CGC RGC RGC RGC RGC RGC RGC RGC RGC RGC RGC RGC RGC RGC RGC GST WTK GAC TAC TGG GGT CAA GGA (SEQ ID NO: 673)
H3-SG15
GTC TAT TAT TGT GCT CGC RGC RGC RGC RGC RGC RGC RGC RGC RGC RGC RGC RGC RGC RGC RGC GST WTK GAC TAC TGG GGT CAA GGA (SEQ ID NO: 674)
H3-SG16
GTC TAT TAT TGT GCT CGC RGC RGC RGC RGC RGC RGC RGC RGC RGC RGC RGC RGC RGC RGC RGC RGC GST WTK GAC TAC TGG GGT CAA GGA (SEQ ID NO: 675)
H3-SG17
GTC TAT TAT TGT GCT CGC RGC RGC RGC RGC RGC RGC RGC RGC RGC RGC RGC RGC RGC RGC RGC RGC RGC GST WTK GAC TAC TGG GGT CAA GGA (SEQ ID NO: 676)

Fig. 20E

Oligonucleotídeos mutagênicos utilizados na construção de bibliotecas SIH3. Degeneração De DNA equimolar são representadas no código IUB (W=A/T, K=G/T, M=A/C, S=G/C, Y=C/T, R=A/G)

H3-SI4
GTC TAT TAT TGT GCT CGC AKC AKC AKC AKC GST WTK GAC TAC TGG GGT CAA GGA (SEQ ID NO: 677)
H3-SI5
GTC TAT TAT TGT GCT CGC AKC AKC AKC AKC AKC GST WTK GAC TAC TGG GGT CAA GGA (SEQ ID NO: 678)
H3-SI6
GTC TAT TAT TGT GCT CGC AKC AKC AKC AKC AKC AKC GST WTK GAC TAC TGG GGT CAA GGA (SEQ ID NO: 679)
H3-SI7
GTC TAT TAT TGT GCT CGC AKC AKC AKC AKC AKC AKC AKC GST WTK GAC TAC TGG GGT CAA GGA (SEQ ID NO: 680)
H3-SI8
GTC TAT TAT TGT GCT CGC AKC AKC AKC AKC AKC AKC AKC AKC GST WTK GAC TAC TGG GGT CAA GGA (SEQ ID NO: 681)
H3-SI9
GTC TAT TAT TGT GCT CGC AKC AKC AKC AKC AKC AKC AKC AKC AKC GST WTK GAC TAC TGG GGT CAA GGA (SEQ ID NO: 682)
H3-SI10
GTC TAT TAT TGT GCT CGC AKC AKC AKC AKC AKC AKC AKC AKC AKC AKC GST WTK GAC TAC TGG GGT CAA GGA (SEQ ID NO: 683)
H3-SI11
GTC TAT TAT TGT GCT CGC AKC AKC AKC AKC AKC AKC AKC AKC AKC AKC AKC GST WTK GAC TAC TGG GGT CAA GGA (SEQ ID NO: 684)
H3-SI12
GTC TAT TAT TGT GCT CGC AKC AKC AKC AKC AKC AKC AKC AKC AKC AKC AKC AKC GST WTK GAC TAC TGG GGT CAA GGA (SEQ ID NO: 685)
H3-SI13
GTC TAT TAT TGT GCT CGC AKC AKC AKC AKC AKC AKC AKC AKC AKC AKC AKC AKC AKC GST WTK GAC TAC TGG GGT CAA GGA (SEQ ID NO: 686)
H3-SI14
GTC TAT TAT TGT GCT CGC AKC AKC AKC AKC AKC AKC AKC AKC AKC AKC AKC AKC AKC AKC GST WTK GAC TAC TGG GGT CAA GGA (SEQ ID NO: 687)
H3-SI15
GTC TAT TAT TGT GCT CGC AKC AKC AKC AKC AKC AKC AKC AKC AKC AKC AKC AKC AKC AKC AKC GST WTK GAC TAC TGG GGT CAA GGA (SEQ ID NO: 688)
H3-SI16
GTC TAT TAT TGT GCT CGC AKC AKC AKC AKC AKC AKC AKC AKC AKC AKC AKC AKC AKC AKC AKC AKC GST WTK GAC TAC TGG GGT CAA GGA (SEQ ID NO: 689)
H3-SI17
GTC TAT TAT TGT GCT CGC AKC AKC AKC AKC AKC AKC AKC AKC AKC AKC AKC AKC AKC AKC AKC AKC AKC GST WTK GAC TAC TGG GGT CAA GGA (SEQ ID NO: 690)

Fig. 20F

Oligonucleotídeos mutagênicos utilizados na construção de bibliotecas SLH3. Degeneração De DNA equimolar são representadas no código IUB (W=A/T, K=G/T, M=A/C, S=G/C, Y=C/T, R=A/G)

H3-SL4
GTC TAT TAT TGT GCT CGC TYA TYA TYA TYA GST WTK GAC TAC TGG GGT CAA GGA (SEQ ID NO: 691)
H3-SL5
GTC TAT TAT TGT GCT CGC TYA TYA TYA TYA TYA GST WTK GAC TAC TGG GGT CAA GGA (SEQ ID NO: 692)
H3-SL6
GTC TAT TAT TGT GCT CGC TYA TYA TYA TYA TYA TYA GST WTK GAC TAC TGG GGT CAA GGA (SEQ ID NO: 693)
H3-SL7
GTC TAT TAT TGT GCT CGC TYA TYA TYA TYA TYA TYA TYA GST WTK GAC TAC TGG GGT CAA GGA (SEQ ID NO: 694)
H3-SL8
GTC TAT TAT TGT GCT CGC TYA TYA TYA TYA TYA TYA TYA TYA GST WTK GAC TAC TGG GGT CAA GGA (SEQ ID NO: 695)
H3-SL9
GTC TAT TAT TGT GCT CGC TYA TYA TYA TYA TYA TYA TYA TYA TYA GST WTK GAC TAC TGG GGT CAA GGA (SEQ ID NO: 696)
H3-SL10
GTC TAT TAT TGT GCT CGC TYA TYA TYA TYA TYA TYA TYA TYA TYA TYA GST WTK GAC TAC TGG GGT CAA GGA (SEQ ID NO: 697)
H3-SL11
GTC TAT TAT TGT GCT CGC TYA TYA TYA TYA TYA TYA TYA TYA TYA TYA TYA GST WTK GAC TAC TGG GGT CAA GGA (SEQ ID NO: 698)
H3-SL12
GTC TAT TAT TGT GCT CGC TYA TYA TYA TYA TYA TYA TYA TYA TYA TYA TYA TYA GST WTK GAC TAC TGG GGT CAA GGA (SEQ ID NO: 699)
H3-SL13
GTC TAT TAT TGT GCT CGC TYA TYA TYA TYA TYA TYA TYA TYA TYA TYA TYA TYA TYA GST WTK GAC TAC TGG GGT CAA GGA (SEQ ID NO: 700)
H3-SL14
GTC TAT TAT TGT GCT CGC TYA TYA TYA TYA TYA TYA TYA TYA TYA TYA TYA TYA TYA TYA GST WTK GAC TAC TGG GGT CAA GGA (SEQ ID NO: 701)
H3-SL15
GTC TAT TAT TGT GCT CGC TYA TYA TYA TYA TYA TYA TYA TYA TYA TYA TYA TYA TYA TYA TYA GST WTK GAC TAC TGG GGT CAA GGA (SEQ ID NO: 702)
H3-SL16
GTC TAT TAT TGT GCT CGC TYA TYA TYA TYA TYA TYA TYA TYA TYA TYA TYA TYA TYA TYA TYA TYA GST WTK GAC TAC TGG GGT CAA GGA (SEQ ID NO: 703)
H3-SL17
GTC TAT TAT TGT GCT CGC TYA TYA TYA TYA TYA TYA TYA TYA TYA TYA TYA TYA TYA TYA TYA TYA TYA GST WTK GAC TAC TGG GGT CAA GGA (SEQ ID NO: 704)

Fig. 20G

Oligonucleotídeos mutagênicos utilizados na construção de bibliotecas SNH3. Degeneração De DNA equimolar são representadas no código IUB (W=A/T, K=G/T, M=A/C, S=G/C, Y=C/T, R=A/G)

H3-SN4
GTC TAT TAT TGT GCT CGC ARC ARC ARC ARC GST WTK GAC TAC TGG GGT CAA GGA (SEQ ID NO: 705)
H3-SN5
GTC TAT TAT TGT GCT CGC ARC ARC ARC ARC ARC GST WTK GAC TAC TGG GGT CAA GGA (SEQ ID NO: 706)
H3-SN6
GTC TAT TAT TGT GCT CGC ARC ARC ARC ARC ARC ARC GST WTK GAC TAC TGG GGT CAA GGA (SEQ ID NO: 707)
H3-SN7
GTC TAT TAT TGT GCT CGC ARC ARC ARC ARC ARC ARC ARC GST WTK GAC TAC TGG GGT CAA GGA (SEQ ID NO: 708)
H3-SN8
GTC TAT TAT TGT GCT CGC ARC ARC ARC ARC ARC ARC ARC ARC GST WTK GAC TAC TGG GGT CAA GGA (SEQ ID NO: 709)
H3-SN9
GTC TAT TAT TGT GCT CGC ARC ARC ARC ARC ARC ARC ARC ARC ARC GST WTK GAC TAC TGG GGT CAA GGA (SEQ ID NO: 710)
H3-SN10
GTC TAT TAT TGT GCT CGC ARC ARC ARC ARC ARC ARC ARC ARC ARC ARC GST WTK GAC TAC TGG GGT CAA GGA (SEQ ID NO: 711)
H3-SN11
GTC TAT TAT TGT GCT CGC ARC ARC ARC ARC ARC ARC ARC ARC ARC ARC ARC GST WTK GAC TAC TGG GGT CAA GGA (SEQ ID NO: 712)
H3-SN12
GTC TAT TAT TGT GCT CGC ARC ARC ARC ARC ARC ARC ARC ARC ARC ARC ARC ARC GST WTK GAC TAC TGG GGT CAA GGA (SEQ ID NO: 713)
H3-SN13
GTC TAT TAT TGT GCT CGC ARC ARC ARC ARC ARC ARC ARC ARC ARC ARC ARC ARC ARC GST WTK GAC TAC TGG GGT CAA GGA (SEQ ID NO: 714)
H3-SN14
GTC TAT TAT TGT GCT CGC ARC ARC ARC ARC ARC ARC ARC ARC ARC ARC ARC ARC ARC ARC GST WTK GAC TAC TGG GGT CAA GGA (SEQ ID NO: 715)
H3-SN15
GTC TAT TAT TGT GCT CGC ARC ARC ARC ARC ARC ARC ARC ARC ARC ARC ARC ARC ARC ARC GST WTK GAC TAC TGG GGT CAA GGA (SEQ ID NO: 716)
H3-SN16
GTC TAT TAT TGT GCT CGC ARC ARC ARC ARC ARC ARC ARC ARC ARC ARC ARC ARC ARC ARC ARC GST WTK GAC TAC TGG GGT CAA GGA (SEQ ID NO: 717)
H3-SN17
GTC TAT TAT TGT GCT CGC ARC ARC ARC ARC ARC ARC ARC ARC ARC ARC ARC ARC ARC ARC ARC ARC GST WTK GAC TAC TGG GGT CAA GGA (SEQ ID NO: 718)

Fig. 20H

Oligonucleotídeos mutagênicos utilizados na construção de bibliotecas SPH3. Degeneração De DNA equimolar são representadas no código IUB (W=A/T, K=G/T, M=A/C, S=G/C, Y=C/T, R=A/G)

H3-SP4
GTC TAT TAT TGT GCT CGC YCT YCT YCT YCT GST WTK GAC TAC TGG GGT CAA GGA (SEQ ID NO: 719)
H3-SP5
GTC TAT TAT TGT GCT CGC YCT YCT YCT YCT YCT GST WTK GAC TAC TGG GGT CAA GGA (SEQ ID NO: 720)
H3-SP6
GTC TAT TAT TGT GCT CGC YCT YCT YCT YCT YCT YCT GST WTK GAC TAC TGG GGT CAA GGA (SEQ ID NO: 721)
H3-SP7
GTC TAT TAT TGT GCT CGC YCT YCT YCT YCT YCT YCT YCT GST WTK GAC TAC TGG GGT CAA GGA (SEQ ID NO: 722)
H3-SP8
GTC TAT TAT TGT GCT CGC YCT YCT YCT YCT YCT YCT YCT YCT GST WTK GAC TAC TGG GGT CAA GGA (SEQ ID NO: 723)
H3-SP9
GTC TAT TAT TGT GCT CGC YCT YCT YCT YCT YCT YCT YCT YCT YCT GST WTK GAC TAC TGG GGT CAA GGA (SEQ ID NO: 724)
H3-SP10
GTC TAT TAT TGT GCT CGC YCT YCT YCT YCT YCT YCT YCT YCT YCT YCT GST WTK GAC TAC TGG GGT CAA GGA (SEQ ID NO: 725)
H3-SP11
GTC TAT TAT TGT GCT CGC YCT YCT YCT YCT YCT YCT YCT YCT YCT YCT YCT GST WTK GAC TAC TGG GGT CAA GGA (SEQ ID NO: 726)
H3-SP12
GTC TAT TAT TGT GCT CGC YCT YCT YCT YCT YCT YCT YCT YCT YCT YCT YCT YCT GST WTK GAC TAC TGG GGT CAA GGA (SEQ ID NO: 727)
H3-SP13
GTC TAT TAT TGT GCT CGC YCT YCT YCT YCT YCT YCT YCT YCT YCT YCT YCT YCT YCT GST WTK GAC TAC TGG GGT CAA GGA (SEQ ID NO: 728)
H3-SP14
GTC TAT TAT TGT GCT CGC YCT YCT YCT YCT YCT YCT YCT YCT YCT YCT YCT YCT YCT YCT GST WTK GAC TAC TGG GGT CAA GGA (SEQ ID NO: 729)
H3-SP15
GTC TAT TAT TGT GCT CGC YCT YCT YCT YCT YCT YCT YCT YCT YCT YCT YCT YCT YCT YCT YCT GST WTK GAC TAC TGG GGT CAA GGA (SEQ ID NO: 730)
H3-SP16
GTC TAT TAT TGT GCT CGC YCT YCT YCT YCT YCT YCT YCT YCT YCT YCT YCT YCT YCT YCT YCT YCT GST WTK GAC TAC TGG GGT CAA GGA (SEQ ID NO: 731)
H3-SP17
GTC TAT TAT TGT GCT CGC YCT YCT YCT YCT YCT YCT YCT YCT YCT YCT YCT YCT YCT YCT YCT YCT YCT GST WTK GAC TAC TGG GGT CAA GGA (SEQ ID NO: 732)

Fig. 20I

Oligonucleotídeos mutagênicos utilizados na construção de bibliotecas SRH3. Degeneração De DNA equimolar são representadas no código IUB (W=A/T, K=G/T, M=A/C, S=G/C, Y=C/T, R=A/G)

H3-SR4
GTC TAT TAT TGT GCT CGC MGC MGC MGC MGC GST WTK GAC TAC TGG GGT CAA GGA (SEQ ID NO: 733)
H3-SR5
GTC TAT TAT TGT GCT CGC MGC MGC MGC MGC MGC GST WTK GAC TAC TGG GGT CAA GGA (SEQ ID NO: 734)
H3-SR6
GTC TAT TAT TGT GCT CGC MGC MGC MGC MGC MGC MGC GST WTK GAC TAC TGG GGT CAA GGA (SEQ ID NO: 735)
H3-SR7
GTC TAT TAT TGT GCT CGC MGC MGC MGC MGC MGC MGC MGC GST WTK GAC TAC TGG GGT CAA GGA (SEQ ID NO: 736)
H3-SR8
GTC TAT TAT TGT GCT CGC MGC MGC MGC MGC MGC MGC MGC MGC GST WTK GAC TAC TGG GGT CAA GGA (SEQ ID NO: 737)
H3-SR9
GTC TAT TAT TGT GCT CGC MGC MGC MGC MGC MGC MGC MGC MGC MGC GST WTK GAC TAC TGG GGT CAA GGA (SEQ ID NO: 738)
H3-SR10
GTC TAT TAT TGT GCT CGC MGC MGC MGC MGC MGC MGC MGC MGC MGC MGC GST WTK GAC TAC TGG GGT CAA GGA (SEQ ID NO: 739)
H3-SR11
GTC TAT TAT TGT GCT CGC MGC MGC MGC MGC MGC MGC MGC MGC MGC MGC MGC GST WTK GAC TAC TGG GGT CAA GGA (SEQ ID NO: 740)
H3-SR12
GTC TAT TAT TGT GCT CGC MGC MGC MGC MGC MGC MGC MGC MGC MGC MGC MGC MGC GST WTK GAC TAC TGG GGT CAA GGA (SEQ ID NO: 741)
H3-SR13
GTC TAT TAT TGT GCT CGC MGC MGC MGC MGC MGC MGC MGC MGC MGC MGC MGC MGC MGC GST WTK GAC TAC TGG GGT CAA GGA (SEQ ID NO: 742)
H3-SR14
GTC TAT TAT TGT GCT CGC MGC MGC MGC MGC MGC MGC MGC MGC MGC MGC MGC MGC MGC MGC GST WTK GAC TAC TGG GGT CAA GGA (SEQ ID NO: 743)
H3-SR15
GTC TAT TAT TGT GCT CGC MGC MGC MGC MGC MGC MGC MGC MGC MGC MGC MGC MGC MGC MGC MGC GST WTK GAC TAC TGG GGT CAA GGA (SEQ ID NO: 744)
H3-SR16
GTC TAT TAT TGT GCT CGC MGC MGC MGC MGC MGC MGC MGC MGC MGC MGC MGC MGC MGC MGC MGC MGC GST WTK GAC TAC TGG GGT CAA GGA (SEQ ID NO: 745)
H3-SR17
GTC TAT TAT TGT GCT CGC MGC MGC MGC MGC MGC MGC MGC MGC MGC MGC MGC MGC MGC MGC MGC MGC MGC GST WTK GAC TAC TGG GGT CAA GGA (SEQ ID NO: 746)

Fig. 20J

Oligonucleotídeos mutagênicos utilizados na construção de bibliotecas STH3. Degeneração De DNA equimolar são representadas no código IUB (W=A/T, K=G/T, M=A/C, S=G/C, Y=C/T, R=A/G)

H3-ST4
GTC TAT TAT TGT GCT CGC ASC ASC ASC ASC GST WTK GAC TAC TGG GGT CAA GGA (SEQ ID NO: 747)
H3-ST5
GTC TAT TAT TGT GCT CGC ASC ASC ASC ASC ASC GST WTK GAC TAC TGG GGT CAA GGA (SEQ ID NO: 748)
H3-ST6
GTC TAT TAT TGT GCT CGC ASC ASC ASC ASC ASC ASC GST WTK GAC TAC TGG GGT CAA GGA (SEQ ID NO: 749)
H3-ST7
GTC TAT TAT TGT GCT CGC ASC ASC ASC ASC ASC ASC ASC GST WTK GAC TAC TGG GGT CAA GGA (SEQ ID NO: 750)
H3-ST8
GTC TAT TAT TGT GCT CGC ASC ASC ASC ASC ASC ASC ASC ASC GST WTK GAC TAC TGG GGT CAA GGA (SEQ ID NO: 751)
H3-ST9
GTC TAT TAT TGT GCT CGC ASC ASC ASC ASC ASC ASC ASC ASC ASC GST WTK GAC TAC TGG GGT CAA GGA (SEQ ID NO: 752)
H3-ST10
GTC TAT TAT TGT GCT CGC ASC ASC ASC ASC ASC ASC ASC ASC ASC ASC GST WTK GAC TAC TGG GGT CAA GGA (SEQ ID NO: 753)
H3-ST11
GTC TAT TAT TGT GCT CGC ASC ASC ASC ASC ASC ASC ASC ASC ASC ASC ASC GST WTK GAC TAC TGG GGT CAA GGA (SEQ ID NO: 754)
H3-ST12
GTC TAT TAT TGT GCT CGC ASC ASC ASC ASC ASC ASC ASC ASC ASC ASC ASC ASC GST WTK GAC TAC TGG GGT CAA GGA (SEQ ID NO: 755)
H3-ST13
GTC TAT TAT TGT GCT CGC ASC ASC ASC ASC ASC ASC ASC ASC ASC ASC ASC ASC ASC GST WTK GAC TAC TGG GGT CAA GGA (SEQ ID NO: 756)
H3-ST14
GTC TAT TAT TGT GCT CGC ASC ASC ASC ASC ASC ASC ASC ASC ASC ASC ASC ASC ASC ASC GST WTK GAC TAC TGG GGT CAA GGA (SEQ ID NO: 757)
H3-ST15
GTC TAT TAT TGT GCT CGC ASC ASC ASC ASC ASC ASC ASC ASC ASC ASC ASC ASC ASC ASC ASC GST WTK GAC TAC TGG GGT CAA GGA (SEQ ID NO: 758)
H3-ST16
GTC TAT TAT TGT GCT CGC ASC ASC ASC ASC ASC ASC ASC ASC ASC ASC ASC ASC ASC ASC ASC ASC GST WTK GAC TAC TGG GGT CAA GGA (SEQ ID NO: 759)
H3-ST17
GTC TAT TAT TGT GCT CGC ASC ASC ASC ASC ASC ASC ASC ASC ASC ASC ASC ASC ASC ASC ASC ASC ASC GST WTK GAC TAC TGG GGT CAA GGA (SEQ ID NO: 760)

Fig. 20K

Oligonucleotídeos mutagênicos utilizados na construção de bibliotecas SWH3. Degeneração De DNA equimolar são representadas no código IUB (W=A/T, K=G/T, M=A/C, S=G/C, Y=C/T, R=A/G)

H3-SW4
GTC TAT TAT TGT GCT CGC TSG TSG TSG TSG GST WTK GAC TAC TGG GGT CAA GGA (SEQ ID NO: 761)
H3-SW5
GTC TAT TAT TGT GCT CGC TSG TSG TSG TSG TSG GST WTK GAC TAC TGG GGT CAA GGA (SEQ ID NO: 762)
H3-SW6
GTC TAT TAT TGT GCT CGC TSG TSG TSG TSG TSG TSG GST WTK GAC TAC TGG GGT CAA GGA (SEQ ID NO: 763)
H3-SW7
GTC TAT TAT TGT GCT CGC TSG TSG TSG TSG TSG TSG TSG GST WTK GAC TAC TGG GGT CAA GGA (SEQ ID NO: 764)
H3-SW8
GTC TAT TAT TGT GCT CGC TSG TSG TSG TSG TSG TSG TSG TSG GST WTK GAC TAC TGG GGT CAA GGA (SEQ ID NO: 765)
H3-SW9
GTC TAT TAT TGT GCT CGC TSG TSG TSG TSG TSG TSG TSG TSG TSG GST WTK GAC TAC TGG GGT CAA GGA (SEQ ID NO: 766)
H3-SW10
GTC TAT TAT TGT GCT CGC TSG TSG TSG TSG TSG TSG TSG TSG TSG TSG GST WTK GAC TAC TGG GGT CAA GGA (SEQ ID NO: 767)
H3-SW11
GTC TAT TAT TGT GCT CGC TSG TSG TSG TSG TSG TSG TSG TSG TSG TSG TSG GST WTK GAC TAC TGG GGT CAA GGA (SEQ ID NO: 768)
H3-SW12
GTC TAT TAT TGT GCT CGC TSG TSG TSG TSG TSG TSG TSG TSG TSG TSG TSG TSG GST WTK GAC TAC TGG GGT CAA GGA (SEQ ID NO: 769)
H3-SW13
GTC TAT TAT TGT GCT CGC TSG TSG TSG TSG TSG TSG TSG TSG TSG TSG TSG TSG TSG GST WTK GAC TAC TGG GGT CAA GGA (SEQ ID NO: 770)
H3-SW14
GTC TAT TAT TGT GCT CGC TSG TSG TSG TSG TSG TSG TSG TSG TSG TSG TSG TSG TSG TSG GST WTK GAC TAC TGG GGT CAA GGA (SEQ ID NO: 771)
H3-SW15
GTC TAT TAT TGT GCT CGC TSG TSG TSG TSG TSG TSG TSG TSG TSG TSG TSG TSG TSG TSG TSG GST WTK GAC TAC TGG GGT CAA GGA (SEQ ID NO: 772)
H3-SW16
GTC TAT TAT TGT GCT CGC TSG TSG TSG TSG TSG TSG TSG TSG TSG TSG TSG TSG TSG TSG TSG TSG GST WTK GAC TAC TGG GGT CAA GGA (SEQ ID NO: 773)
H3-SW17
GTC TAT TAT TGT GCT CGC TSG TSG TSG TSG TSG TSG TSG TSG TSG TSG TSG TSG TSG TSG TSG TSG TSG GST WTK GAC TAC TGG GGT CAA GGA (SEQ ID NO: 774)

Fig. 20L

Oligonucleotídeos mutagênicos utilizados na construção de bibliotecas SYH3. Degeneração De DNA equimolar são representadas no código IUB (W=A/T, K=G/T, M=A/C, S=G/C, Y=C/T, R=A/G)

H3-SY4
GTC TAT TAT TGT GCT CGC TMT TMT TMT TMT GST WTK GAC TAC TGG GGT CAA GGA (SEQ ID NO: 775)
H3-SY5
GTC TAT TAT TGT GCT CGC TMT TMT TMT TMT TMT GST WTK GAC TAC TGG GGT CAA GGA (SEQ ID NO: 776)
H3-SY6
GTC TAT TAT TGT GCT CGC TMT TMT TMT TMT TMT TMT GST WTK GAC TAC TGG GGT CAA GGA (SEQ ID NO: 777)
H3-SY7
GTC TAT TAT TGT GCT CGC TMT TMT TMT TMT TMT TMT TMT GST WTK GAC TAC TGG GGT CAA GGA (SEQ ID NO: 778)
H3-SY8
GTC TAT TAT TGT GCT CGC TMT TMT TMT TMT TMT TMT TMT TMT GST WTK GAC TAC TGG GGT CAA GGA (SEQ ID NO: 779)
H3-SY9
GTC TAT TAT TGT GCT CGC TMT TMT TMT TMT TMT TMT TMT TMT TMT GST WTK GAC TAC TGG GGT CAA GGA (SEQ ID NO: 780)
H3-SY10
GTC TAT TAT TGT GCT CGC TMT TMT TMT TMT TMT TMT TMT TMT TMT TMT GST WTK GAC TAC TGG GGT CAA GGA (SEQ ID NO: 781)
H3-SY11
GTC TAT TAT TGT GCT CGC TMT TMT TMT TMT TMT TMT TMT TMT TMT TMT TMT GST WTK GAC TAC TGG GGT CAA GGA (SEQ ID NO: 782)
H3-SY12
GTC TAT TAT TGT GCT CGC TMT TMT TMT TMT TMT TMT TMT TMT TMT TMT TMT TMT GST WTK GAC TAC TGG GGT CAA GGA (SEQ ID NO: 783)
H3-SY13
GTC TAT TAT TGT GCT CGC TMT TMT TMT TMT TMT TMT TMT TMT TMT TMT TMT TMT TMT GST WTK GAC TAC TGG GGT CAA GGA (SEQ ID NO: 784)
H3-SY14
GTC TAT TAT TGT GCT CGC TMT TMT TMT TMT TMT TMT TMT TMT TMT TMT TMT TMT TMT TMT GST WTK GAC TAC TGG GGT CAA GGA (SEQ ID NO: 785)
H3-SY15
GTC TAT TAT TGT GCT CGC TMT TMT TMT TMT TMT TMT TMT TMT TMT TMT TMT TMT TMT TMT TMT GST WTK GAC TAC TGG GGT CAA GGA (SEQ ID NO: 786)
H3-SY16
GTC TAT TAT TGT GCT CGC TMT TMT TMT TMT TMT TMT TMT TMT TMT TMT TMT TMT TMT TMT TMT TMT GST WTK GAC TAC TGG GGT CAA GGA (SEQ ID NO: 787)
H3-SY17
GTC TAT TAT TGT GCT CGC TMT TMT TMT TMT TMT TMT TMT TMT TMT TMT TMT TMT TMT TMT TMT TMT TMT GST WTK GAC TAC TGG GGT CAA GGA (SEQ ID NO: 788)

Fig. 21A

Clones ligantes de HER2 SXH3

| | CDRL3 | | | | | | | | | | CDRH1 | | | | | | | | | | CDRH2 | | | | | | | | | | | | | | | | | CDRH3 | | | | | | | | | | | | | | | | |

Fig. 21B

Clone	Sinal do ELISA a 450 nm							Fab-Fago IC50 (nM)	
	VEGF humano	HER2 humano	DR5 humano	Insulina humana	Neutravidin	IGF-1 humano	Albumina de soro bovino	IC50 (nM)	Erro +/-
B1	0.03	[illegible]	0.01	0.08	0.01	0.02	0.00	6.28	0.38
B2	0.01	[illegible]	0.00	0.05	0.01	0.02	-0.01	4.40	0.42
B3	0.01	[illegible]	-0.01	0.05	0.00	0.02	-0.01	5.77	0.47
B4	0.05	[illegible]	0.01	0.08	0.00	0.01	-0.02	14.64	1.04
B5	0.00	[illegible]	0.00	0.08	-0.01	0.00	-0.02	9.26	0.80
B6	0.05	[illegible]	0.00	0.06	0.02	0.02	-0.02	0.82	0.09
B7	0.05	[illegible]	0.00	0.05	0.05	0.01	-0.03	2.54	0.48
B8	0.10	[illegible]	0.01	0.07	0.04	0.07	-0.03	2.10	0.30
B9	0.04	[illegible]	0.00	0.02	0.04	0.02	-0.02	0.72	0.10
B10	0.03	[illegible]	0.00	0.04	0.02	0.03	-0.02	3.76	0.50
B11	0.07	[illegible]	-0.02	0.12	0.08	0.05	-0.02	0.85	0.03
B12	0.09	[illegible]	0.00	0.06	0.09	0.10	0.00	6.66	0.42
B13	0.01	[illegible]	0.01	0.12	0.03	0.04	-0.01	1.10	0.07
B14	0.13	[illegible]	0.02	0.09	0.07	0.03	0.01	1.36	0.32
B15	0.03	[illegible]	0.01	0.05	0.02	0.02	0.01	1.75	0.24
B16	0.03	[illegible]	0.01	0.06	0.02	0.01	0.01	1.77	0.10
B17	0.03	[illegible]	0.01	0.04	0.04	0.02	0.01	5.76	0.32
B18	0.01	[illegible]	0.01	0.04	0.02	0.03	0.01	0.93	0.37
B20	0.04	[illegible]	0.06	0.03	0.01	0.05	-0.03	1.56	0.39
B21	0.01	[illegible]	0.01	0.08	0.02	0.03	0.00	1.54	0.04
B22	0.00	[illegible]	0.03	0.02	0.03	0.02	0.03	2.72	0.29
B23	0.03	[illegible]	0.06	0.03	0.03	0.01	-0.01	1.46	0.07
B24	0.03	[illegible]	0.04	0.01	0.00	-0.02	-0.02	2.03	0.21
B25	0.04	[illegible]	0.03	0.08	0.03	-0.01	0.02	70.40	6.80
B26	0.01	[illegible]	0.02	0.04	0.02	-0.01	0.00	>100	N/D
B27	0.03	[illegible]	0.00	0.06	0.01	-0.02	0.01	71.70	6.50
B28	0.00	[illegible]	-0.01	0.07	0.03	-0.01	0.01	N/D	N/D

Fig. 22

Biblioteca de superfície binária

		SY		SW		SR		SF	
CDR	Posição	Tipo de aminoácido	Razão molecular de aminoácido	Tipo de aminoácido	Razão molecular de aminoácido	Tipo de aminoácido	Razão molecular de aminoácido	Tipo de aminoácido	Razão molecular de aminoácido
L3	91	S,Y	50, 50	S,W	50, 50	S,R	50, 50	S,F	50, 50
	92	S,Y	50, 50	S,W	50, 50	S,R	50, 50	S,F	50, 50
	93	S,Y	50, 50	S,W	50, 50	S,R	50, 50	S,F	50, 50
	94	S,Y	50, 50	S,W	50, 50	S,R	50, 50	S,F	50, 50
	95	S,Y	50, 50	S,W	50, 50	S,R	50, 50	S,F	50, 50
H1	28	S,Y	50, 50	S,W	50, 50	S,R	50, 50	S,F	50, 50
	30	S,Y	50, 50	S,W	50, 50	S,R	50, 50	S,F	50, 50
	31	S,Y	50, 50	S,W	50, 50	S,R	50, 50	S,F	50, 50
	32	S,Y	50, 50	S,W	50, 50	S,R	50, 50	S,F	50, 50
	33	S,Y	50, 50	S,W	50, 50	S,R	50, 50	S,F	50, 50
H2	50	S,Y	50, 50	S,W	50, 50	S,R	50, 50	S,F	50, 50
	52	S,Y	50, 50	S,W	50, 50	S,R	50, 50	S,F	50, 50
	53	S,Y	50, 50	S,W	50, 50	S,R	50, 50	S,F	50, 50
	54	S,Y	50, 50	S,W	50, 50	S,R	50, 50	S,F	50, 50
	56	S,Y	50, 50	S,W	50, 50	S,R	50, 50	S,F	50, 50
	58	S,Y	50, 50	S,W	50, 50	S,R	50, 50	S,F	50, 50
H3	95								
	96								
	97	S,Y	50, 50	S,W	50, 50	S,R	50, 50	S,F	50, 50
	98								
	99								
	100								
	100x	G, A	50, 50	G, A	50, 50	G, A	50, 50	G, A	50, 50
	100x	I, M, L, F	25, 25, 25, 25	I, M, L, F	25, 25, 25, 25	I, M, L, F	25, 25, 25, 25	I, M, L, F	25, 25, 25, 25

Fig. 23

Oligonucleotídeos mutagênicos utilizados na construção de bibliotecas SF, SR, SW. Degenerações De DNA equimolar são representadas no código IUB (M=A/C, S=G/C, Y=C/T)

H1-SF
GCA GCT TCT GGC TTC TYC ATT TYC TYC TYC TYC ATA CAC TGG GTG CGT (SEQ ID NO: 1005)
H2-SF
CTG GAA TGG GTT GCA TYC ATT TYC CCA TYC TYC GGT TYC ACT TYC TAT GCC GAT AGC GTC (SEQ ID NO: 1006)
L3-SF
ACT TAT TAC TGT CAG CAA TYC TYC TYC TYC CCA TYC ACG TTC GGA CAG GGT ACC (SEQ ID NO: 1007)
H1-SR
GCA GCT TCT GGC TTC MGC ATT MGC MGC MGC MGC ATA CAC TGG GTG CGT (SEQ ID NO: 1008)
H2-SR
CTG GAA TGG GTT GCA MGC ATT MGC CCA MGC MGC GGT MGC ACT MGC TAT GCC GAT AGC GTC (SEQ ID NO: 1009)
L3-SR
ACT TAT TAC TGT CAG CAA MGC MGC MGC MGC CCA MGC ACG TTC GGA CAG GGT ACC (SEQ ID NO: 1010)
H1-SW
GCA GCT TCT GGC TTC TSG ATT TSG TSG TSG TSG ATA CAC TGG GTG CGT (SEQ ID NO: 1011)
H2-SW
CTG GAA TGG GTT GCA TSG ATT TSG CCA TSG TSG GGT TSG ACT TSG TAT GCC GAT AGC GTC (SEQ ID NO: 1012)
L3-SW
ACT TAT TAC TGT CAG CAA TSG TSG TSG TSG CCA TSG ACG TTC GGA CAG GGT ACC (SEQ ID NO: 1013)

Fig. 24A

Clones de ligante HER2 Superficie SX

| | CDRL3 | | | | | | | | | | CDRH1 | | | | | | | | | | CDRH2 | | | | | | | | | | | | | | | CDRH3 | | | | | | | | | | | | | | |

Fig. 24B

	Sinal de ELISA a 540 nM							Fab-fago IC50	
Clone	VEGF humano	HER 2 humano	DR5 humano	Insulina humana	Neutravidin	IGF-1 humano	Albumina de soro bovino	IC50 (nM)	Erro +/-
G29	0.33	3.67	0.06	0.26	0.26	0.32	0.02	1.96	0.22
G30	0.13	3.72	0.04	0.19	0.17	0.29	0.01	1.26	0.21
G31	0.09	3.70	0.07	0.22	0.12	0.26	-0.01	1.66	0.07
G32	0.35	3.67	0.13	0.48	0.43	0.52	0.08	1.12	0.14
G33	0.09	3.73	0.11	0.10	0.06	0.15	0.00	1.70	0.10
G34	0.16	3.67	0.13	0.18	0.18	0.35	0.01	1.06	0.27
G35	0.03	3.62	0.12	0.37	0.29	0.25	0.03	0.65	0.14
G36	0.38	3.61	0.14	0.29	0.26	0.30	0.01	1.20	0.19
G37	0.25	3.71	0.21	0.45	0.32	0.32	0.03	0.31	0.09
G40	0.31	3.68	0.10	3.31	0.45	0.85	0.03	1.80	0.30
G41	0.04	3.72	0.04	0.08	0.08	0.07	0.01	51.00	6.00
G42	0.02	3.69	0.17	0.14	0.06	0.07	0.03	43.00	7.00
G43	0.13	3.67	0.06	0.14	0.29	0.37	0.03	22.00	3.00
G44	0.04	3.70	0.05	0.11	0.13	0.29	-0.02	29.00	3.00
G46	0.02	3.75	0.03	0.07	0.07	0.10	0.00	73.00	11.00
G48	0.09	3.69	0.04	0.04	0.01	0.01	0.01	67.00	11.00
G49	0.02	3.66	0.04	0.04	0.00	0.05	0.01	3.13	0.37
G50	0.12	3.72	0.11	0.05	0.10	0.10	0.02	7.94	0.42
G51	0.05	3.73	0.10	0.03	0.04	0.08	-0.01	3.28	0.24
G53	0.00	3.68	0.02	0.02	0.08	0.08	-0.03	9.75	1.76
G54	0.05	3.70	0.06	0.05	0.03	0.05	-0.02	2.44	0.73
G55	0.05	3.69	0.06	0.04	0.06	0.05	-0.03	6.52	0.73
G56	0.01	3.72	0.08	0.11	0.05	0.07	-0.01	7.13	0.88
G58	0.05	3.73	0.08	0.08	0.06	0.36	0.00	15.10	0.82
G59	0.02	3.45	0.05	0.02	0.05	0.04	0.00	6.80	0.99
G60	0.07	3.61	0.08	0.07	0.03	0.09	-0.01	79.80	17.20
G61	0.09	3.75	0.09	0.07	0.12	0.09	-0.02	145.00	42.00

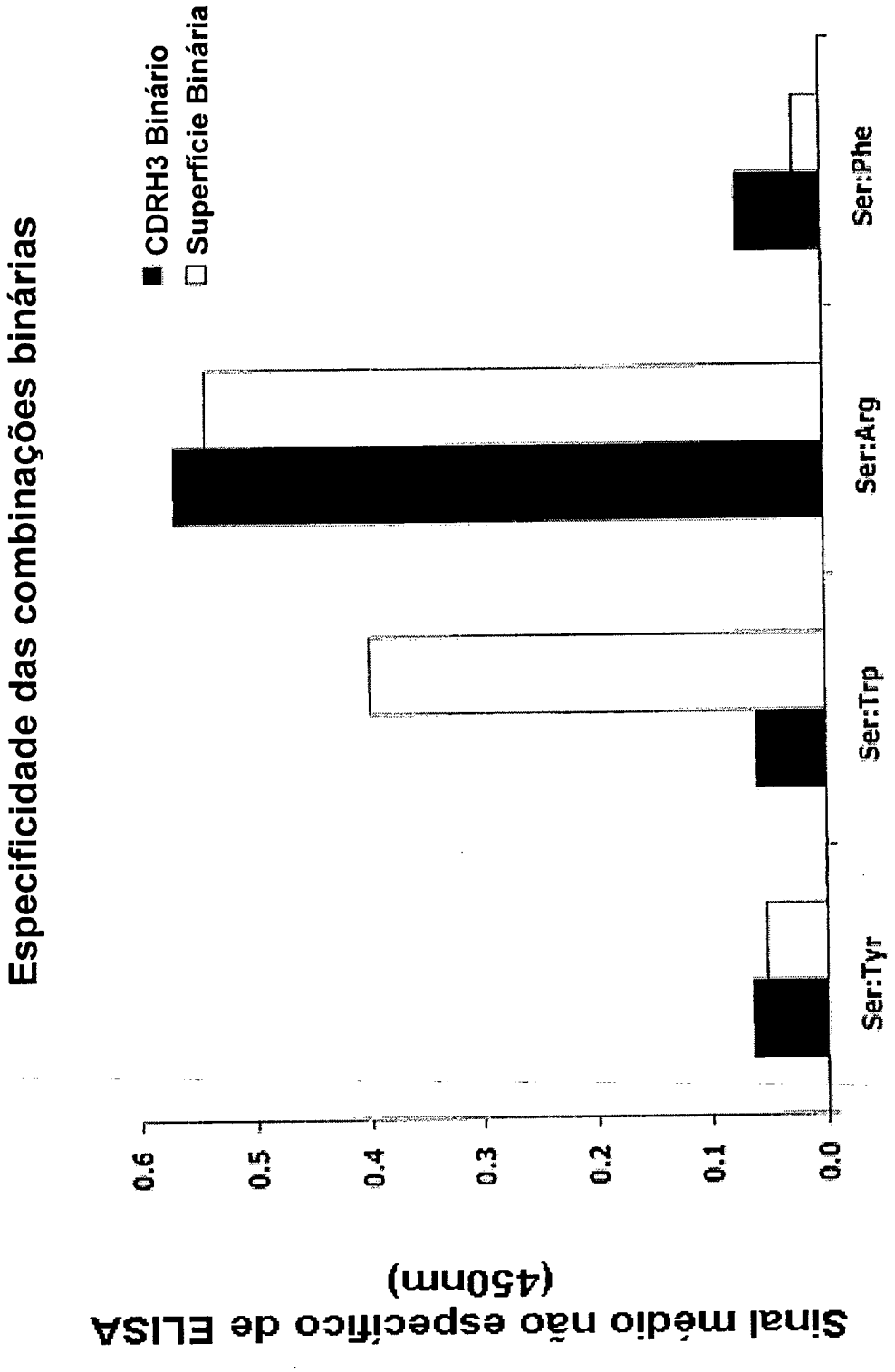
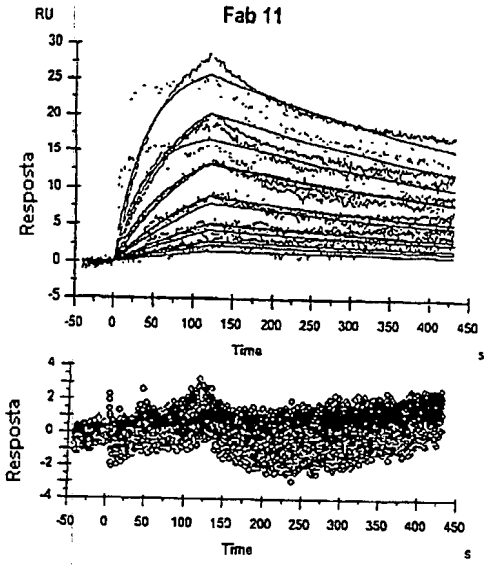

Especificidade das combinações binárias
CDRH3 Binário
Superfície Binária
Sinal médio não específico de ELISA (450nm)
0.0
0.1
0.2
0.3
0.4
0.5
0.6
Ser:Tyr
Ser:Trp
Ser:Arg
Ser:Phe
Combinação binária

Fig. 25

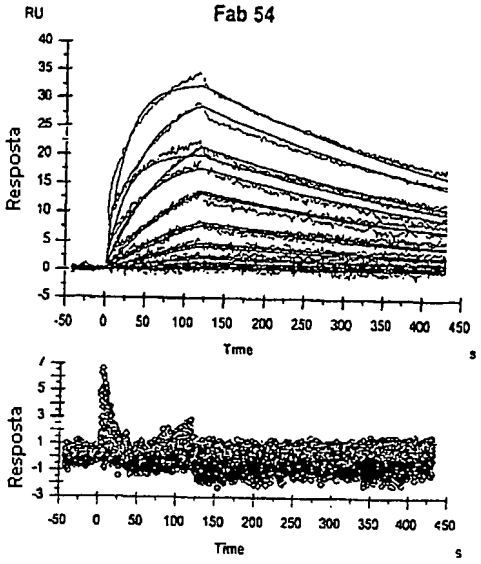
SXH3-B11



k_a = 1.9 x 10^6 $M^{-1}s^{-1}$
k_d = 1.7 x 10^{-3} s^{-1}
K_D = 890 pM
$R_{max,1}$ = 19 RU
$R_{max,2}$ = 29 RU

* Maior concentração de analito removida devido a regeneração incompleta

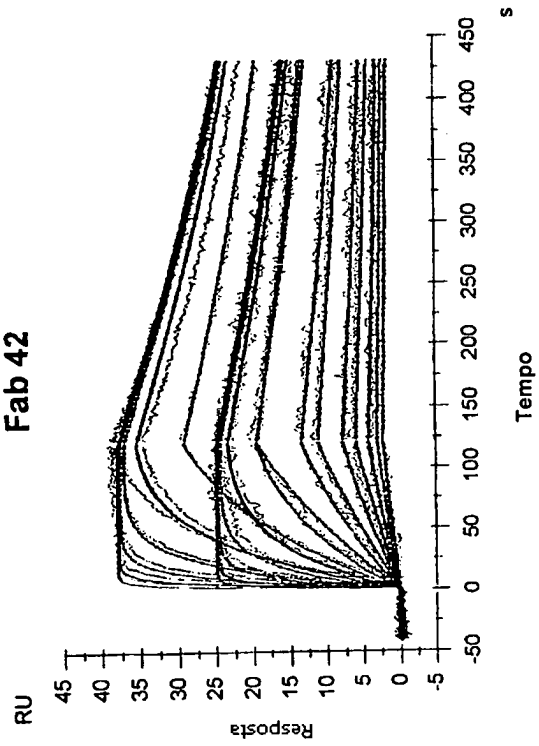
SX-superfície-G54



k_a = 2.0 x 10^5 $M^{-1}s^{-1}$
k_d = 2.2 x 10^{-3} s^{-1}
K_D = 11 nM
$R_{max,1}$ = 21 RU
$R_{max,2}$ = 34 RU

Fig. 26A

YSGR-A-42



$k_a = 2.7 \times 10^6\ M^{-1}s^{-1}$
$k_d = 1.5 \times 10^{-3}\ s^{-1}$
$K_D = 570\ pM$
$R_{max,1} = 25\ RU$
$R_{max,2} = 38\ RU$

Fig. 26B

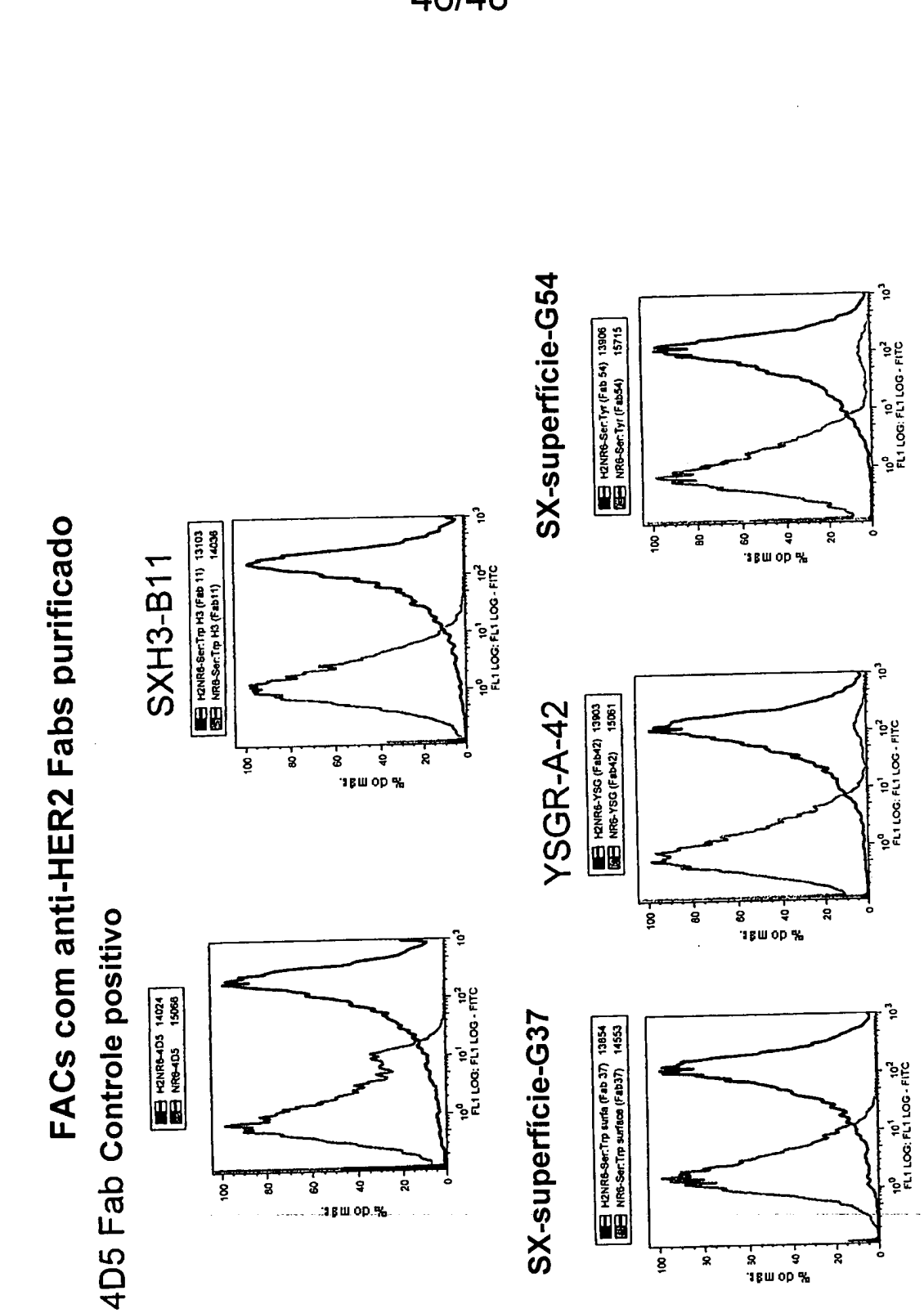

FACs com anti-HER2 Fabs purificado
4D5 Fab Controle positivo
SXH3-B11
SX-superfície-G54
YSGR-A-42
SX-superfície-G37
% do máx.
FL1 LOG: FL1 LOG - FITC

Fig. 27

Fig. 28

IgGs ligantes de HER2

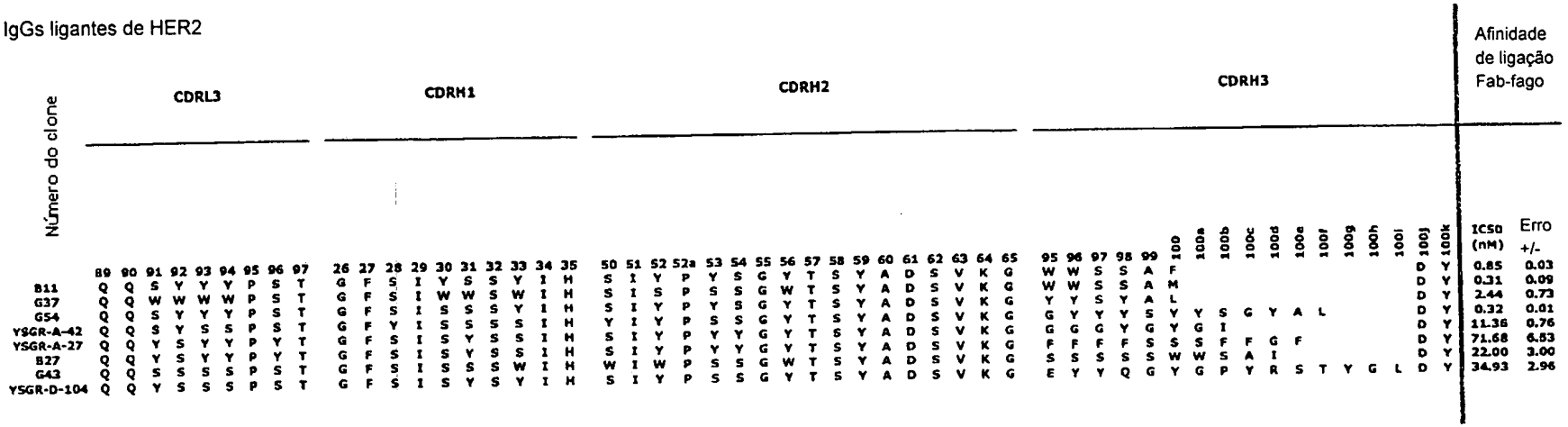


Fig. 29

Sinal do ELISA @ 450 nm

IgG Revestido

IgG incubado @ 100 nM	SXH3-B11	SX-superfície G37	YSGR-A-42	SX-superfície G54	YSGR-A-27	SXH3-B27	SX-superfície G43	YSGR-D-104	Omnitarg	Herceptin
SXH3-B11	0.10	0.06	0.07	0.06	1.54	0.24	1.22	0.96	1.60	1.55
SX-Superfície G37	0.11	0.06	0.08	0.06	1.73	0.49	1.58	1.22	1.72	1.68
YSGR-A-42	0.09	0.06	0.06	0.05	1.67	1.18	1.57	1.40	1.53	1.45
SX-superfície-G54	0.32	0.16	0.30	0.13	1.55	0.27	1.37	1.23	1.48	1.15
YSGR-A-27	2.10	1.17	1.90	2.02	0.06	0.08	0.05	0.16	1.28	1.13
SXH3-B27	1.97	1.12	1.95	1.70	0.11	0.06	0.05	0.16	1.33	1.16
SX-superfície-G43	2.02	1.20	1.93	1.76	0.12	0.07	0.04	0.20	1.30	1.14
YSGR D-104	2.25	1.32	2.28	1.93	0.10	0.07	0.06	0.14	1.78	1.02

Controle positivo para bloqueio de ligação

Competição da ligação

RESUMO

"POLIPEPTÍDEOS, ANTICORPO, POLIPEPTÍDEO DE FUSÃO, COMPOSIÇÃO, POLINUCLEOTÍDEO, VETOR, CÉLULA HOSPEDEIRA, MÉTODO DE PRODUÇÃO DE UM POLIPEPTÍDEO, BIBLIOTECA DE POLIPEPTÍDEOS, MÉTODOS PARA GERAR UMA COMPOSIÇÃO, MÉTODO PARA A SELEÇÃO DE UM DOMÍNIO VARIÁVEL LIGANTE AO ANTÍGENO, MÉTODO PARA SELECIONAR POLIPEPTÍDEOS, MÉTODO PARA ISOLAR UM OU MAIS POLIPEPTÍDEOS, MÉTODO PARA O TRATAMENTO DE CÂNCER E MÉTODO PARA TRATAR"

A invenção fornece anticorpos ou fragmentos destes ligantes ao antígeno para DR5 e HER-2. Os anticorpos e/ou fragmentos destes ligantes ao antígeno consistem de variantes de CDR que compreende uma diversidade de seqüências de aminoácidos altamente restritas. A invenção fornece também estes polipeptídeos como polipeptídeos de fusão para polipeptídeos heterólogos, tais como, pelo menos uma porção do fago ou proteínas da cápside viral, marcadores e ligantes. Além disso, fornece composições e métodos de utilização para o tratamento do câncer e de doenças autoimunes relacionadas.

REIVINDICAÇÕES

1 POLIPEPTÍDEO, que compreende um domínio variável da cadeia pesada de imunoglobina no qual:

(i) CDRH1 compreende uma seqüência de aminoácidos: G-F-X1-I-X2-X3-X4-X5-I-H (SEQ ID No: 22), no qual G é a posição 26 e X1 é a posição 28 de acordo com o sistema de numeração de Kabat; no qual, X1 é selecionado de S e Y; no qual, X2 é selecionado de Y e S; no qual, X3 é selecionado de Y e S; no qual, X4 é selecionado de Y e S; no qual, X5 é selecionado de Y e S;

(ii) CDRH2 compreende uma seqüência de aminoácidos: X1-I-X2-P-X3-X4-G-X5-T-X6-Y-A-D-S-V-K-G (SEQ ID No: 23), no qual X1 é a posição 50, de acordo com o sistema de numeração de Kabat; no qual, X1 é selecionado de Y e S; no qual X2 é selecionado de Y e S; no qual, X3 é selecionado de Y e S; no qual, X4 é selecionado de Y e S; no qual, X5 é selecionado de Y e S, e no qual X6 selecionado de Y e S; e

(iii) CDRH3 compreende uma seqüência de aminoácidos: X1-X2-X3-X4-X5-x6-X7-X8-X9-X10-X11-X12-X13-X.14-X15-X16-D-Y (SEQ ID No ED: 31), no qual, X1 é a posição 95 de acordo com o sistema de numeração de Kabat, e no qual X1 é selecionado de R, Y, M; X2 é selecionado de Y e R; X3 é selecionado de Y, S, R, P e G, X4 é selecionado de Y e S; X5 é selecionado de Y, S, R e H; X6 é selecionado de R, Y e S; X7 é selecionado de G, Y e S; X8 é selecionado de R, Y e S; X9 é selecionado de G, Y e S; X10 é selecionado de R, Y e S; X11 é selecionado de G, Y e S; X12 é selecionado de S, Y, R, G e A; X13 é selecionado de G e Y; X14 é selecionado de L, M, R, G e A; e X15 é selecionado de G, F e L ou não está presente, e X16 é F ou não está presente.

2 POLIPEPTÍDEO, que compreende um domínio variável da cadeia pesada de imunoglobulina, no qual:

(i) CDRH1 compreende uma seqüência de aminoácidos: G-F-X1-

I-X2-X3-X4-X5-I-H (SEQ ID No: 22), no qual G é a posição 26 e X1 é a posição 28 de acordo com o sistema de numeração de Kabat; no qual X1 é selecionado de Y e S; no qual X2 é selecionado de Y e S; no qual, X3 é selecionado de Y e S; no qual, X4 é selecionado de Y e S; no qual, X5 é selecionado de Y e S;

(ii) CDRH2 compreende uma seqüência de aminoácidos: X1-I-X2-P-X3-X4-G-X5-T-X6-Y-A-D-S-V-K-G (SEQ ID No: 23), no qual X1 é a posição 50, de acordo com o sistema de numeração de Kabat; no qual, X1 é selecionado de Y e S; no qual X2 é selecionado de Y e S; no qual, X3 é selecionado de Y e S; no qual, X4 é selecionado de Y e S; no qual, X5 é selecionado de Y e S, e no qual X6 selecionado de Y e S; e

(iii) CDRH3 compreende uma seqüência de aminoácidos: X1-X2-X3-X4-X5-x6-X7-X8-X9-X10-X11-X12-X13-X14-X15-X16-X17-X18-X19-D-Y (SEQ ID No ED: 24), no qual, X1 é a posição 95 de acordo com o sistema de numeração de Kabat, caracterizada pelo fato dos aminoácidos em cada uma das posições de X1-X6 serem selecionados a partir de um *pool* de aminoácidos numa razão molar de 50% de Y, 25% de S, e 25% de G; caracterizada pelo fato dos aminoácidos em cada uma das posições de X7-X17 serem selecionados a partir de um *pool* de aminoácidos numa razão molar de 50% de Y, 25% de S e 25% de G, ou não estarem presentes; no qual X18 é selecionado de G e A, e no qual X19 é selecionado de I, M, L e F.

3 POLIPEPTÍDEO, que compreende um domínio variável da cadeia pesada de imunoglobulina, no qual:

(i) CDRH1 compreende uma seqüência de aminoácidos: G-F-X1-I-X2-X3-X4-X5-I-H (SEQ ID No: 22), no qual G é a posição 28 e X1 é a posição 28 de acordo com o sistema de numeração de Kabat; no qual X1 é selecionado de Y e S; no qual X2 é selecionado de Y e S; no qual, X3 é selecionado de Y e S; no qual, X4 é selecionado de Y e S; no qual, X5 é selecionado de Y e S;

(ii) CDRH2 compreende uma seqüência de aminoácidos: X1-I-X2-

P-X3-X4-G-X5-T-X6-Y-A-D-S-V-K-G (SEQ ID No: 23), no qual, X1 é a posição 50, de acordo com o sistema de numeração de Kabat; no qual, X1 é selecionado de Y e S; no qual, X2 é selecionado de Y e S; no qual, X3 é selecionado de Y e S; no qual, X4 é selecionado de Y e S; no qual, X5 é selecionado de Y e S, e no qual, X6 selecionado de Y e S; e

(iii) CDRH3 compreende uma seqüência de aminoácidos: X1-X2-X3-X4-X5-X6-X7-X8-X9-X10-X11-X12-X13-X14-X15-X16-X17-X18-X19-D-Y (SEQ ID No ED: 26), no qual, X1 é a posição 95 de acordo com o sistema de numeração de Kabat, caracterizada pelo fato dos aminoácidos em cada uma das posições de X1-X6 serem selecionados a partir de um *pool* de aminoácidos numa razão molar de 25% de Y, 50% de S, e 25% de R; caracterizada pelo fato dos aminoácidos em cada uma das posições de X7-X17 serem selecionados a partir de um *pool* de aminoácidos numa razão molar de 25% de Y, 50% de S e 25% de R, ou não estarem presentes; no qual, X18 é selecionado de G e A; e no qual, X19 é selecionado de I, M, L e F.

4 POLIPEPTÍDEO, que compreende um domínio variável da cadeia pesada de imunoglobulina, no qual:

(i) CDRH1 compreende uma seqüência de aminoácidos: G-F-X1-I-X2-X3-X4-X5-I-H (SEQ ID No: 22), no qual G é a posição 26 e X1 é a posição 28 de acordo com o sistema de numeração de Kabat; no qual X1 é selecionado de Y e S; no qual X2 é selecionado de Y e S; no qual, X3 é selecionado de Y e S; no qual, X4 é selecionado de Y e S; no qual, X5 é selecionado de Y e S;

(ii) CDRH2 compreende uma seqüência de aminoácidos: X1-I-X2-P-X3-X4-G-X5-T-X6-Y-A-D-S-V-K-G (SEQ ID No: 23), no qual, X1 é a posição 50, de acordo com o sistema de numeração de Kabat; no qual, X1 é selecionado de Y e S; no qual, X2 é selecionado de Y e S; no qual, X3 é selecionado de Y e S; no qual, X4 é selecionado de Y e S; no qual, X5 é selecionado de Y e S, e no qual, X6 selecionado de Y e S; e

(iii) CDRH3 compreende uma seqüência de aminoácidos: X1-X2-X3-X4-X5-X6-X7-X8-X9-X10-X11-X12-X13-X14-X15-X16-X17-X18-X19-D-Y (SEQ ID No ED: 27), no qual, X1 é a posição 95 de acordo com o sistema de numeração de Kabat, caracterizada pelo fato dos aminoácidos em cada uma das posições de X1-X6 serem selecionados a partir de um *pool* de aminoácidos numa razão molar de 38% de Y, 25% de S, e 25% de G e 12% de R; caracterizada pelo fato dos aminoácidos em cada uma das posições de X7-X17 serem selecionados a partir de um *pool* de aminoácidos numa razão molar de 38% de Y, 25% de S, e 25% de G e 12% de R, ou não estarem presentes; no qual, X18 é selecionado de G e A, e no qual, X19 é selecionado de I, M, L e F.

5 POLIPEPTÍDEO, que compreende um domínio variável da cadeia pesada de imunoglobulina, no qual:

(i) CDRH1 compreende uma seqüência de aminoácidos: G-F-X1-I-X2-X3-X4-X5-I-H (SEQ ID No: 22), no qual, G é a posição 26 e X1 é a posição 28 de acordo com o sistema de numeração de Kabat; no qual, X1 é selecionado de Y e S; no qual, X2 é selecionado de Y e S; no qual, X3 é selecionado de Y e S; no qual, X4 é selecionado de Y e S; no qual, X5 é selecionado de Y e S;

(ii) CDRH2 compreende uma seqüência de aminoácidos: X1-I-X2-P-X3-X4-G-X5-T-X6-Y-A-D-S-V-K-G (SEQ ID No: 23), no qual, X1 é a posição 50, de acordo com o sistema de numeração de Kabat; no qual, X1 é selecionado de Y e S; no qual, X2 é selecionado de Y e S; no qual, X3 é selecionado de Y e S; no qual, X4 é selecionado de Y e S; no qual, X5 é selecionado de Y e S, e no qual, X6 selecionado de Y e S; e

(iii) CDRH3 compreende uma seqüência de aminoácidos: X1-X2-X3-X4-X5-X6-X7-X8-X9-X10-X11-X12-X13-X14-X15-X16-X17-X18-X19-D-Y (SEQ ID No ED: 28), no qual, X1 é a posição 95 de acordo com o sistema de numeração de Kabat, caracterizada pelo fato dos aminoácidos em cada uma

das posições de X1-X6 serem selecionados a partir de um *pool* de aminoácidos numa razão molar de 20% de Y, 26% de S, 26% de G, 13% de R, 1% de A, 1% de D, 1% de E, 1% de F, 1% de H, 1% de I, 1% de K, 1% de L, 1% de M, 1% de N, 1% de P, 1% de Q, 1% de T, 1% de V e 1% de W; caracterizada pelo fato dos aminoácidos em cada uma das posições de X7-X17 serem selecionados a partir de um *pool* de aminoácidos numa razão molar de 20% de Y, 26% de S, 26% de G, 13% de R, 1% de A, 1% de D, 1% de E, 1% de F, 1% de H, 1% de I, 1% de K, 1% de L, 1% de M, 1% de N, 1% de P, 1% de Q, 1% de T, 1% de V e 1% de W, ou não estão presentes; no qual, X18 é selecionado de G e A, e no qual, X19 é selecionado de I, M, L e F.

6 POLIPEPTÍDEO, de acordo com uma das reivindicações de 1 a 5, caracterizado pelo fato do CDRH1 compreender uma seqüência de aminoácidos selecionada de qualquer uma das SEQs ID Nos: 524-540 e 189-294.

7 POLIPEPTÍDEO, de acordo com uma das reivindicações de 1 a 5, caracterizado pelo fato do CDRH2 compreender uma seqüência de aminoácidos selecionada de qualquer uma das SEQs ID Nos: 541-557 e 295-400.

8 POLIPEPTÍDEO, de acordo com uma das reivindicações de 1 a 5, caracterizado pelo fato do CDRH3 compreender uma seqüência de aminoácidos selecionada de qualquer uma das SEQs ID Nos: 558-574 e 401-506.

9 POLIPEPTÍDEO, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato da posição do aminoácido X1 no CDRH3 é a posição 95 e é este é selecionado de R e Y; X3 é a posição 97 e é S; X8 é a posição do aminoácido 100b e é S; X9 é a posição do aminoácido 100c e é Y; X10 e é a posição do aminoácido 100d e é Y ou R.

10 POLIPEPTÍDEO, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato da posição do CRDH3 possuir a seqüência de aminoácido X1-R-S-Y-R-Y-G-S-Y-X10-G-S-Y-X14-F-D-Y (SEQ ID No.: 575).

11 POLIPEPTÍDEO, de acordo com uma das reivindicações

de 1 a 10, caracterizado pelo fato do polipeptídeo se ligar ao DR5 humano.

12 POLIPEPTÍDEO de acordo com a reivindicação 11, caracterizado pelo fato de que o polipeptídeo é um anticorpo.

13 POLIPEPTÍDEO de acordo com a reivindicação 12, caracterizado pelo fato de que o domínio variável da cadeia pesada compreende:

i) um CDRH1 contendo uma seqüência de aminoácidos GFYISSSSIH (SEQ ID No: 576);

ii) um CDRH2 contendo uma seqüência de aminoácidos SISPSSGSTYYADSVKG (SEQ NO ID: 577); e

iii) um CDRH3 contendo uma seqüência de aminoácidos YRSYRYGSYYGSYGFDY (SEQ NO ID: 578).

14 POLIPEPTÍDEO, de acordo com a reivindicação 12, caracterizado pelo fato de que o domínio pesado da cadeia variável compreende:

i) um CDRH1 contendo uma seqüência de aminoácidos GFYISSSSIH (SEQ ID No: 579);

ii) um CDRH2 contendo uma seqüência de aminoácidos SISPSSGYTSYADSVKG (SEQ NO ID: 580); e

iii) um CDRH3 contendo uma seqüência de aminoácidos RRSYRYGSYRGSYAFDY (SEQ NO ID: 581).

15 POLIPEPTÍDEO, de acordo com uma das reivindicações de 1 a 14, caracterizado pelo fato do polipeptídeo se ligar ao DR5 humano e murino.

16 POLIPEPTÍDEO, de acordo com uma das reivindicações de 1 a 15 que consta adicionalmente de um domínio variável da cadeia leve, no qual:

(i) CDRL3 compreende uma seqüência de aminoácidos Q-Q-X1-X2-X3-X4-P-X5-T (ID SEQ NO: 25); no qual, X1 é a posição 91 e é

selecionado de Y, H e S; X2 é selecionado de Y e S; X3 é selecionado de Y, S e T; X4 é selecionado de Y, S e T, e X5 é selecionado de S, P e Y.

17 POLIPEPTÍDEO, de acordo com a reivindicação 16, caracterizado pelo fato de que compreende adicionalmente um CDRL1 que possuir a seqüência de aminoácidos RASQDVNTAVA (ID SEQ NO: 29).

18 POLIPEPTÍDEO, de acordo com a reivindicação 16, caracterizado pelo fato de que compreende adicionalmente um CDRL2 que possuir a seqüência de aminoácidos SASSLYS (ID SEQ NO: 30).

19 POLIPEPTÍDEO, que compreende um domínio variável da cadeia pesada de imunoglobulina, no qual:

(i) CDRH1 compreende uma seqüência de aminoácidos: G-F-X1-I-X2-X3-X4-X5-I-H (SEQ ID No: 22), no qual, X1 é a posição 28 de acordo com o sistema de numeração de Kabat e é selecionado de S e Y; X2 é selecionado de S e Y; X3 é selecionado de S e Y; X4 é selecionado de S e Y; X5 é selecionado de S e Y;

(ii) CDRH2 compreende uma seqüência de aminoácidos: X1-I-X2-P-X3-X4-G-X5-T-X6-Y-A-D-S-V-K-G (SEQ ID No: 23), no qual, X1 é a posição 50, de acordo com o sistema de numeração de Kabat e é selecionado de S e Y; X2 é selecionado de S e Y; X3 é selecionado de S e Y; X4 é selecionado de S e Y; X5 é selecionado de S e Y, e X6 selecionado de S e Y; e

(iii) CDRH3 compreende uma seqüência de aminoácidos: X1-X2-X3-X4-X5-X6-X7- D-Y (SEQ ID No: 582), no qual, X1 é a posição do aminoácido 95 de acordo com o sistema de numeração de Kabat e é selecionado de S e Y; X2 é selecionado de S e Y e R; X3 é selecionado de S, G, Y e H; X4 é selecionado de S, G, Y e R; X5 é selecionado de G e A; X6 é selecionado de F, M, L e A; e X7 é selecionado de F, M e L ou está ausente.

20 POLIPEPTÍDEO, de acordo com a reivindicação 19, caracterizado pelo fato do CDRH1 compreender uma seqüência de

aminoácidos selecionada das SEQ ID Nos: 189-198.

21 POLIPEPTÍDEO, de acordo com a reivindicação 19, caracterizado pelo fato do CDRH2 compreender uma seqüência de aminoácidos selecionada das SEQ ID Nos: 295-304.

22 POLIPEPTÍDEO, de acordo com a reivindicação 19, caracterizado pelo fato do CDRH3 compreender uma seqüência de aminoácidos selecionada das SEQ ID Nos: 401-410.

23 POLIPEPTÍDEO, que compreende um domínio variável da cadeia pesada de imunoglobulina, no qual:

(i) CDRH1 compreende uma seqüência de aminoácidos: G-F-X1-I-X2-X3-X4-X5-I-H (SEQ ID No: 22), no qual, X1 é a posição 28 de acordo com o sistema de numeração de Kabat e é selecionado de S e Y; X2 é selecionado de S e Y; X3 é selecionado de S e Y; X4 é selecionado de S e Y; X5 é selecionado de S e Y;

(ii) CDRH2 compreende uma seqüência de aminoácidos: X1-I-X2-P-X3-X4-G-X5-T-X6-Y-A-D-S-V-K-G (SEQ ID No: 22), no qual, X1 é a posição 50, de acordo com o sistema de numeração de Kabat e é selecionado de S e Y; X2 é selecionado de S e Y; X3 é selecionado de S e Y; X4 é selecionado de S e Y; X5 é selecionado de S e Y, e

(iii) CDRH3 compreende uma seqüência de aminoácidos: X1-X2-X3-X4-X5-X6-X7-X8-D-Y (SEQ ID No: 583), no qual, X1 é a posição do aminoácido 95 de acordo com o sistema de numeração de Kabat e é selecionado de Y, S e G; X2 é selecionado de Y, S, G, R e A; X3 é selecionado de G, Y, S e R; X4 é selecionado de G, Y e F; X5 é selecionado de Y, S, N e G; X6 é selecionado de Y, R, H e W; e X7 é selecionado de G e A; e X8 é selecionado de F, M, L e I.

24 POLIPEPTÍDEO, de acordo com a reivindicação 23, caracterizado pelo fato do CDRH1 compreender uma seqüência de

aminoácidos selecionada das SEQ ID Nos: 199-216.

25 POLIPEPTÍDEO, de acordo com a reivindicação 23, caracterizado pelo fato do CDRH2 compreender uma seqüência de aminoácidos selecionada das SEQ ID Nos: 305-322.

26 POLIPEPTÍDEO, de acordo com a reivindicação 23, caracterizado pelo fato do CDRH3 compreender uma seqüência de aminoácidos selecionada das SEQ ID Nos: 411-428.

27 POLIPEPTÍDEO, que compreende um domínio variável da cadeia pesada de imunoglobulina, no qual:

(i) CDRH1 compreende uma seqüência de aminoácidos: G-F-X1-I-X2-X3-X4-X5-I-H (SEQ ID No: 22), no qual, X1 é a posição 28 de acordo com o sistema de numeração de Kabat e é selecionado de S e Y; X2 é selecionado de S e Y; X3 é selecionado de S e Y; X4 é selecionado de S e Y; X5 é selecionado de S e Y;

(ii) CDRH2 compreende uma seqüência de aminoácidos: X1-I-X2-P-X3-X4-G-X5-T-X6-Y-A-D-S-V-K-G (SEQ ID No: 23), no qual, X1 é a posição 50, de acordo com o sistema de numeração de Kabat e é selecionado de S e Y; X2 é selecionado de S e Y; X3 é selecionado de S e Y; X4 é selecionado de S e Y; X5 é selecionado de S e Y, e

(iii) CDRH3 compreende uma seqüência de aminoácidos: X1-X2-X3-X4-X5-X6-X7-X8-X9-X10-X11-X12-X13-X14-X15-X16-X17-X18-X19-D-Y (SEQ ID No: 584), no qual, X1 é a posição do aminoácido 95 é selecionado de Y, S, R e G; X2 é selecionado de Y, S, R e G; X3 é selecionado de S, Y, G e W; X4 é selecionado de S, Y, G e Q; X5 é selecionado de G, Y e S; X6 é selecionado de G, Y S, R e V; X7 é selecionado de S, Y, G e R; X8 é selecionado de Y, S, G, R, P e V; X9 é selecionado de G, A,Y,S e R; X10 é selecionado de M, F, G, Y, S e R; X11 é selecionado de A, Y, S, G e R; X12 é selecionado de I, M, F, L, A, G, S, Y, R e T; X13 é selecionado de F, M, L, G,

A,Y, T E S ou não está presente; X14 é selecionado de L, M, F, I, G, Y, A e T; e X15 é selecionado de M, L, Y, G e R ou não está presente; X16 é selecionado de Y e G ou não está presente; X17 é selecionado de R, M e G ou não está presente; X18 é selecionado de P e A ou não está presente; e X18 é L ou não está presente.

28 POLIPEPTÍDEO, que compreende um domínio variável da cadeia pesada de imunoglobulina, no qual:

(i) CDRH1 compreende uma seqüência de aminoácidos: G-F-X1-I-X2-X3-X4-X5-I-H (SEQ ID No: 22), caracterizado pelo fato de que G é a posição 26 e X1 é a posição 28 de acordo com o sistema de numeração de Kabat; e no qual X1-X5 são aminoácidos naturalmente presentes que não a cisteína;

(ii) CDRH2 compreende uma seqüência de aminoácidos: X6-I-X7-P-X8-X9-G-X10-T-X11-Y-A-D-S-V-K-G, no qual, X6 é a posição 50 de acordo com o sistema de numeração de Kabat, e no qual, X6-X11 são aminoácidos naturalmente presentes que não a cisteína; e

(iii) CDRH3 compreende uma seqüência de aminoácidos: X12-X13-X14-X15-X16-$(X17)_n$-X18-X19-D-Y, no qual X12 é a posição 95 de acordo com o sistema de numeração de Kabat; e no qual, n é um número adequado que manterá a atividade funcional do domínio variável da cadeia pesada; e no qual, X12-X19 são aminoácidos naturalmente presentes que não a cisteína.

29 POLIPEPTÍDEO, de acordo com a reivindicação 28, caracterizado pelo fato de que n é um número de 1 a 12.

30 POLIPEPTÍDEO, de acordo com a reivindicação 28, caracterizado pelo fato de que X1 é selecionado de Y e S; X2 é selecionado de Y e S; X3 é selecionado de Y e S; X4 é selecionado de Y e S; X5 é selecionado de Y e S; e X6 é selecionado de Y e S.

31 POLIPEPTÍDEO, de acordo com a reivindicação 28, caracterizado pelo fato de que X6 é selecionado de Y e S; X7 é selecionado de

Y e S; X8 é selecionado de Y e S; X9 é selecionado de Y e S; X10 é selecionado de Y e S; e X11 é selecionado de Y e S.

32 POLIPEPTÍDEO, de acordo com a reivindicação 28, caracterizado pelo fato de que os aminoácidos em cada uma das posições X12-X17 são selecionados a partir de um *pool* de aminoácidos numa razão molar de 50% de Y, 25% de S e 25% de G, e X18 é selecionado de G e A, e X19 é selecionado de I, M, L, e F.

33 POLIPEPTÍDEO, de acordo com a reivindicação 28, caracterizado pelo fato de que os aminoácidos em cada uma das posições X12-X17 são selecionados a partir de um *pool* de aminoácidos numa razão molar de 25% de Y, 50% de S e 25% de R, no qual X18 é selecionado de G e A, e X19 é selecionado de I, M, L, e F.

34 POLIPEPTÍDEO, de acordo com a reivindicação 28, caracterizado pelo fato de que os aminoácidos em cada uma das posições X12-X17 são selecionados a partir de um *pool* de aminoácidos numa razão molar de 38% de Y, 25% de S, 25% de G e 12% de R, no qual X18 é selecionado de G e A, e X19 é selecionado de I, M, L, e F.

35 POLIPEPTÍDEO, de acordo com a reivindicação 28, caracterizado pelo fato de que os aminoácidos em cada uma das posições X12-X17 são selecionados a partir de um *pool* de aminoácidos numa razão molar de 20% Y, 26% S, 26% G, 13% R, 1% A, 1% D, 1% E, 1% F, 1% H, 1% I, 1% K, 1% L, 1% M, 1% N, 1% P, 1% Q, 1% T, 1% V, e de 1% W; no qual, X18 é selecionada de G e A; e X19 é selecionado de I, M, L, e F.

36 POLIPEPTÍDEO, de acordo com uma das reivindicações de 27-35, caracterizado pelo fato do CDRH1 compreender uma seqüência de aminoácidos selecionada de qualquer uma das SEQ ID Nos: 217-294.

37 POLIPEPTÍDEO, de acordo com uma das reivindicações de 27-35, caracterizado pelo fato do CDRH2 compreender uma seqüência de

aminoácidos selecionada de qualquer uma das SEQ ID Nos: 323-400.

38 POLIPEPTÍDEO, de acordo com uma das reivindicações de 27-35, caracterizado pelo fato do CDRH3 compreender uma seqüência de aminoácidos selecionada de qualquer uma das SEQ ID Nos: 429-506.

39 POLIPEPTÍDEO, que compreende um domínio variável da cadeia pesada de imunoglobulina, no qual:

(i) CDRH1 compreende uma seqüência de aminoácidos: G-F-X1-I-X2-X3-X4-X5-I-H, caracterizado pelo fato de que G é a posição 26 e X1 é a posição 28 de acordo com o sistema de numeração de Kabat; no qual, X1 é selecionado de Y e S; no qual, X2 é selecionado de Y e S; no qual, X3 é selecionado de Y e S; no qual, X4 é selecionado de Y e S; no qual, X5 é selecionado de Y e S;

(ii) CDRH2 compreende uma seqüência de aminoácidos: X1-I-X2-P-X3-X4-G-X5-T-X6-Y-A-D-S-V-K-G, caracterizado pelo fato de que X1 é a posição 50 de acordo com o sistema de numeração de Kabat ; no qual, X1 é selecionado de Y e S; no qual, X2 é selecionado de Y e S; no qual, X3 é selecionado de Y e S; no qual, X4 é selecionado de Y e S; no qual, X5 é selecionado de Y e S; e no qual, X6 selecionado de Y e S; e

(iii) CDRH3 compreende uma seqüência de aminoácidos: X1-X2-X3-X4-X5-X6-X7-X8-X9-X10-X11-X12-X13-X14-X15-X16-X17-X18-X19, caracterizado pelo fato de que X1 é a posição 95 de acordo com o sistema de numeração de Kabat, e no qual os aminoácidos em cada uma das posições de X1-X17 são selecionadas de A, C, F, G, I, L, N, P, R, T, W ou Y, ou não estão presentes; X18 é selecionado de G e A; e X19 é selecionado de F, L, I, e M.

40 POLIPEPTÍDEO, de acordo com a reivindicação 39, caracterizado pelo fato do CDRH1 compreender uma seqüência de aminoácidos selecionada das SEQ ID Nos: 816-842.

41 POLIPEPTÍDEO, de acordo com a reivindicação 39,

caracterizado pelo fato do CDRH2 compreender uma seqüência de aminoácidos selecionada das SEQ ID Nos: 843-869.

42 POLIPEPTÍDEO, de acordo com a reivindicação 39, caracterizado pelo fato do CDRH3 compreender uma seqüência de aminoácidos selecionada das SEQ ID Nos: 870-896.

43 POLIPEPTÍDEO, que compreende um domínio variável da cadeia pesada de imunoglobulina, no qual:

(i) CDRH1 compreende uma seqüência de aminoácidos: G-F-X1-I-X2-X3-X4-X5-I-H, caracterizado pelo fato de que G é a posição 26 e X1 é a posição 28 de acordo com o sistema de numeração de Kabat; e no qual os aminoácidos em cada uma das posições de X1-X5 são selecionadas de S e um dentre F, L, I e M; e

(ii) CDRH2 compreende uma seqüência de aminoácidos: X1-I-X2-P-X3-X4-G-X5-T-X6-Y-A-D-S-V-K-G, caracterizado pelo fato de que X1 é a posição 50 de acordo com o sistema de numeração de Kabat ; e no qual os aminoácidos em cada uma das posições de X1-X6 são selecionadas de S e um dentre F, L, I e M; e

(iii) CDRH3 compreende uma seqüência de aminoácidos: X1-X2-X3-X4-X5-X6-X7-X8-X9-X10-X11-X12-X13-X14-X15-X16-X17-X18-X19, caracterizado pelo fato de que X1 é a posição 95 de acordo com o sistema de numeração de Kabat, e os aminoácidos em cada uma das posições de X1-X19 são selecionadas a partir S e um dentre Y, W, R ou F, ou não esta presente; X18 é selecionado a partir de G e A; e X19 é selecionado de F, L, I, e M.

44 POLIPEPTÍDEO, de acordo com a reivindicação 43, caracterizado pelo fato do CDRH1 compreender uma seqüência de aminoácidos selecionada das SEQ ID Nos: 924-950.

45 POLIPEPTÍDEO, de acordo com a reivindicação 43, caracterizado pelo fato do CDRH2 compreender uma seqüência de

aminoácidos selecionada das SEQ ID Nos: 951-977.

46 POLIPEPTÍDEO, de acordo com a reivindicação 43, caracterizado pelo fato do CDRH3 compreender uma seqüência de aminoácidos selecionada das SEQ ID Nos: 978-1004.

47 POLIPEPTÍDEO, de acordo com uma das reivindicações de 2 a 8 ou 16 a 46, caracterizado pelo fato do polipeptídeo se ligar ao HER-2 humano.

48 POLIPEPTÍDEO, de acordo com a reivindicação 47, caracterizado pelo fato de que o polipeptídeo é um anticorpo.

49 POLIPEPTÍDEO, de acordo com a reivindicação 39 ou 40, caracterizado pelo fato de que o domínio variável da cadeia pesada compreende:

i) um CDRH1 contendo uma seqüência de aminoácidos GFSIYSSYIH (SEQ ID No: 821);

ii) um CDRH2 contendo uma seqüência de aminoácidos SIYPYSGYTSYADSVKG (SEQ ID No: 848); e

iii) um CDRH3 contendo uma seqüência de aminoácidos WWSSAFDY (SEQ ID No: 875).

50 POLIPEPTÍDEO, de acordo com a reivindicação 39 ou 40, caracterizado pelo fato de que o domínio variável da cadeia pesada compreende:

i) um CDRH1 contendo uma seqüência de aminoácidos GFSIWWSWIH (SEQ ID NO: 932);

ii) um CDRH2 contendo uma seqüência de aminoácidos SISPSSGWTSYADSVKG (SEQ ID No: 959); e

iii) um CDRH3 contendo uma seqüência de aminoácidos WWSSAMDY (SEQ ID No: 986).

51 POLIPEPTÍDEO, de acordo com a reivindicação 39 ou 40, caracterizado pelo fato de que o domínio variável da cadeia pesada

compreende:

i) um CDRH1 contendo uma seqüência de aminoácidos GFSISSSYIH (SEQ ID No: 944);

ii) um CDRH2 contendo uma seqüência de aminoácidos SIYPYSGYTSYADSVKG (SEQ ID No: 971); e

iii) um CDRH3 contendo uma seqüência de aminoácidos YYSYALDY (SEQ ID No: 998).

52 POLIPEPTÍDEO, de acordo com a reivindicação 39 ou 40, caracterizado pelo fato de que o domínio variável da cadeia pesada compreende:

i) um CDRH1 contendo uma seqüência de aminoácidos GFYISSSSIH (SEQ ID No: 230);

ii) um CDRH2 contendo uma seqüência de aminoácidos YIYPSSGYTSYADSVKG (SEQ ID No: 336); e

iii) um CDRH3 contendo uma seqüência de aminoácidos GYYYSYYSGYALDY (SEQ ID No: 442).

53 POLIPEPTÍDEO, de acordo com uma das reivindicações de 19-52, que consta adicionalmente de um domínio variável da cadeia leve, no qual:

(i) CDRL3 compreende uma seqüência de aminoácidos Q-Q-X_1-X_2-X_3-X_4-P-X_5-T (ID SEQ NO: 25); caracterizado pelo fado de que X_1 é a posição 91 de acordo com o sistema de numeração de Kabat e é selecionado de S e Y; X_2 é selecionado de S, Y e F; X_3 é selecionado de Y; X_4 é selecionado de Y e S, e X_5 é selecionado de S e Y.

54 POLIPEPTÍDEO, que compreende um domínio variável da cadeia leve possuindo uma seqüência CDRL3 onde o CDRL3 possuí a seqüência de aminoácidos Q-Q-X1-X2-X3-X4-P-X5-T (SEQ ID No: 25), em que X1 é a posição 91 de acordo com a numeração de Kabat e é selecionado de S e Y; X2 é selecionado de S, Y e F; X3 é selecionado de Y, S, F; X4 é

selecionado de Y e S; X5 é selecionado de S e Y.

55 POLIPEPTÍDEO, que compreende um domínio variável da cadeia leve de imunoglobulina, onde o CDRL3 compreende uma seqüência de aminoácidos Q-Q-X1-X2-X3-X4-P-X5-T; no qual, X1 é a posição 91 de acordo com o sistema de numeração de Kabat e os aminoácidos em cada uma das posições de X1-X5 são selecionadas de S e um dentre Y, W, R ou F.

56 POLIPEPTÍDEO, que compreende um domínio variável da cadeia leve de imunoglobulina, no qual:

(i) CDRL1 compreende uma primeira seqüência consenso hipervariável ou variante desta contendo uma substituição em uma ou mais posições, em comparação com a seqüência consenso hipervariável correspondente;

(ii) CDRL2 compreende uma segunda seqüência consenso hipervariável ou variante desta contendo uma substituição em uma ou mais posições, em comparação com a seqüência consenso hipervariável correspondente, e

(iii) CDRL3 compreende uma seqüência de aminoácidos: Q-Q-X1-X2-X3-$(X4)_n$-X5-X6-T, caracterizado pelo fato de que X1 é a posição 91 de acordo com o sistema de numeração de Kabat.

57 POLIPEPTÍDEO, de acordo com a reivindicação 56, caracterizado pelo fato de que X1 é a posição 91 de acordo com o sistema de numeração de Kabat e X1 é selecionado de Y e S; X2 é selecionado de Y e S; X3 é selecionado de Y e S; X4 é selecionado de Y e S; X5 é selecionado de P e L; e X6 é selecionado de F, L, I e V.

58 POLIPEPTÍDEO de acordo com a reivindicação 56, caracterizado pelo fato de que n é um número de 1 a 3.

59 POLIPEPTÍDEO, de acordo com uma das reivindicações de 54 a 58, caracterizado pelo fato do CDRL3 compreender uma seqüência de

aminoácidos selecionada das SEQ ID Nos: 83-188, 789-815 e 897-923.

60 POLIPEPTÍDEO, de acordo com uma das reivindicações de 54 a 58, caracterizado pelo fato de incluir adicionalmente um CDRL1 que compreende uma seqüência de aminoácidos RASQDVNTAVA (ID SEQ NO: 29).

61 POLIPEPTÍDEO, de acordo com uma das reivindicações 54 a 58 e reivindicações 55 ou 56, caracterizado pelo fato de incluir adicionalmente um CDRL2 que compreende uma seqüência de aminoácidos SASSLYS (SEQ ID No: 30).

62 ANTICORPO, que compreende um polipeptídeo que possuí um domínio variável da cadeia pesada de imunoglobulina, de acordo com uma das reivindicações de 1 a 53, e um polipeptídeo que possuí um domínio variável da cadeia leve de imunoglobulina de acordo com uma das reivindicações de 54 a 61.

63 POLIPEPTÍDEO, incluindo pelo menos dois domínios variáveis de anticorpo compreendendo:

(a) um domínio variável da cadeia pesada do anticorpo compreendendo o polipeptídeo de uma das reivindicações de 1 a 53; e

(b) um domínio variável da cadeia leve do anticorpo compreendendo o polipeptídeo de uma das reivindicações de 54 a 61.

64 POLIPEPTÍDEO, de acordo com uma das reivindicações de 1 a 63, caracterizado pelo fato de que o polipeptídeo é um Fv de cadeia única.

65 POLIPEPTÍDEO, de acordo com uma das reivindicações de 1 a 63, caracterizado pelo fato de que o polipeptídeo é um polipeptídeo Fab.

66 POLIPEPTÍDEO, de acordo com uma das reivindicações de 1 a 58, caracterizado pelo fato de que o polipeptídeo é um polipeptídeo completamente humano.

67 POLIPEPTÍDEO, de acordo com uma das reivindicações de 1 a 66, que compreende adicionalmente das regiões de suporte FR1, FR2,

FR3, e/ou FR4 para um polipeptídeo do domínio variável correspondente à variante de CDRH1, CDRH2, CDRH3, e/ou CDRL3, onde as regiões de suporte são obtidas de um único polipeptídeo modelo.

68 POLIPEPTÍDEO, de acordo com a reivindicação 67, caracterizado pelo fato de que cada uma das regiões de suporte compreende uma seqüência de aminoácidos correspondente a região de suporte das seqüências de aminoácidos do polipeptídeo 4D5 (SEQ ID No: 1 e 2).

69 ANTICORPO, de acordo com a reivindicação 67, caracterizado pelo fato de que o anticorpo consta da região de suporte correspondente a seqüência de aminoácidos da região de suporte variante do anticorpo 4D5 (SEQ ID No: 14-17 e 18-21).

70 POLIPEPTÍDEO, de acordo com uma das reivindicações de 1 a 69, caracterizado pelo fato de que o polipeptídeo compreende adicionalmente de um domínio de dimerização ligado a região C-terminal do polipeptídeo do domínio variável da cadeia pesada.

71 POLIPEPTÍDEO, de acordo com a reivindicação 70, caracterizado pelo fato de que o domínio de dimerização contém um domínio com zíper de leucina ou uma seqüência que possuí pelo menos um resíduo de cisteína.

72 POLIPEPTÍDEO, de acordo com a reivindicação 70, caracterizado pelo fato de que o domínio de dimerização compreende uma região de dobradiça de um polipeptídeo e um zíper de leucina.

73 POLIPEPTÍDEO, de acordo com a reivindicação 70, caracterizado pelo fato de que o domínio de dimerização é uma única cisteína.

74 POLIPEPTÍDEO DE FUSÃO, compreendendo um polipeptídeo de acordo com uma das reivindicações de 1 a 73, caracterizado pelo fato de que o polipeptídeo do domínio variável está fundido a pelo menos uma porção de uma proteína da cápside viral.

75 POLIPEPTÍDEO DE FUSÃO, de acordo com a

reivindicação 74, caracterizado pelo fato da cápside viral ser selecionada do grupo que compreende a proteína pIII, proteína maior da cápside pVIII, Soc, Hoc, gpD, pv1, e variantes destes.

76 POLIPEPTÍDEO DE FUSÃO, de acordo com a reivindicação 75, que consta adicionalmente de um domínio de dimerização entre o domínio variável e a proteína da cápside viral.

77 POLIPEPTÍDEO DE FUSÃO, de acordo com a reivindicação 74, que consta adicionalmente um peptídeo marcado.

78 POLIPEPTÍDEO DE FUSÃO, de acordo com a reivindicação 77, caracterizado pelo fato do peptídeo marcado ser selecionado de um grupo que consiste de gD, c-myc, poli-his, uma proteína fluorescente e B-galactosidase.

79 COMPOSIÇÃO, que contenha um polipeptídeo de uma das reivindicações de 1 a 78 e um veículo.

80 POLINUCLEOTÍDEO, que codifica um polipeptídeo de uma das reivindicações de 1 a 78.

81 VETOR, que contenha o polinucleotídeo da reivindicação 80.

82 CÉLULA HOSPEDEIRA, que contenha o vetor da reivindicação 81.

83 MÉTODO DE PRODUÇÃO DE UM POLIPEPTÍDEO, que compreende no cultivo da célula hospedeira da reivindicação 82 sob condições adequadas para a produção de um polipeptídeo e recuperação do polipeptídeo ou do fragmento de ligação ao antígeno deste.

84 BIBLIOTECA DE POLIPEPTÍDEOS, que compreende uma variedade de polipeptídeos de uma das reivindicações de 1 a 78 e na qual a biblioteca tem pelo menos 1×10^4 seqüências de domínios variáveis de anticorpos.

85 MÉTODO PARA GERAR UMA COMPOSIÇÃO, que incluí

uma variedade de polipeptídeos compreendendo em:

(a) produzir uma variedade de polipeptídeos que inclui:

(i) CDRH1 compreende uma seqüência de aminoácidos: G-F-X1-I-X2-X3-X4-X5-I-H, caracterizado pelo fato de que G é posição 26 e X1 é posição 28 de acordo com o sistema de numeração de Kabat; no qual o aminoácido X1 é selecionado de Y e S; X2 é selecionado de Y e S; X3 é selecionado de Y e S; X4 é selecionado de Y e S; e X5 é selecionado de Y e S;

(ii) CDRH2 compreende uma seqüência de aminoácidos: X1-I-X2-P-X3-X4-G-X5-T-X6-Y-A-D-S-V-K-G, caracterizado pelo fato de que X1 é posição 50 de acordo com o sistema de numeração de Kabat ; no qual o aminoácido X1 é selecionado de Y e S; X2 é selecionado de Y e S; X3 é selecionado de Y e S; X4 é selecionado de Y e S; X5 é selecionado de Y e S; e X6 é selecionado de Y e S; e

(iii) CDRH3 compreende uma seqüência de aminoácidos: X1-X2-X3-X4-X5-X6-X7-X8-X9-X10-X11-X12-X13-X14-X15-X16-X17-X18-X19, caracterizado pelo fato de que X1 é posição 95 de acordo com o sistema de numeração de Kabat, no qual os aminoácidos em cada uma das posições de X1-X17 são selecionados de S e um dentre A, C, F, G, I, L, N, P, R, T, W ou Y, ou não esta presente; X18 é selecionado de G e A; e X19 é selecionado de F, L, I, e M.

86 MÉTODO PARA GERAR UMA COMPOSIÇÃO, que inclui uma variedade de polipeptídeos compreendendo em:

(a) produzir uma variedade de polipeptídeos que inclui:

(i) CDRH1 compreende uma seqüência de aminoácidos: G-F-X1-I-X2-X3-X4-X5-I-H, caracterizado pelo fato de que G é posição 26 e X1 é posição 28 de acordo com o sistema de numeração de Kabat; no qual os aminoácidos em cada uma das posições de X1-X5 são selecionados de S e um dentre Y, W, R e F;

(ii) CDRH2 compreende uma seqüência de aminoácidos: X1-I-

X2-P-X3-X4-G-X5-T-X6-Y-A-D-S-V-K-G, caracterizado pelo fato de que X1 é posição 50 de acordo com o sistema de numeração de Kabat ; no qual os aminoácidos em cada uma das posições de X1-X6 são selecionados de S e um dentre Y, W, R e F; e

(iii) CDRH3 compreende uma seqüência de aminoácidos: X1-X2-X3-X4-X5-X6-X7-X8-X9-X10-X11-X12-X13-X14-X15-X16-X17-X18-X19, caracterizado pelo fato de que X1 é posição 95 de acordo com o sistema de numeração de Kabat, no qual os aminoácidos em cada uma das posições de X1-X19 são selecionados de S e um dentre Y, W, R e , ou não esta presente; no qual X18 é selecionado de G e A; e no qual X19 é selecionado de F, L, I, e M.

87 MÉTODO, de acordo com a reivindicação 85 ou 86, caracterizado pelo fato de que o método compreende em:

(b) produzir uma variedade de polipeptídeos que inclui:

(i) CDKL1 compreendendo uma primeira seqüência consenso hipervariável ou variante desta contendo a substituição em uma ou mais posições comparada a seqüência consenso hipervariável correspondente;

(ii) CDRL2 compreendendo uma segunda seqüência consenso hipervariável ou variante desta contendo a substituição em uma ou mais posições comparada a seqüência consenso hipervariável correspondente; e

(iii) CDRL3 compreendendo uma seqüência de aminoácido: Q-Q-X1-X2-X3-X4-X5-X6-X7-X8-T, no qual X1 é posição 91 de acordo com o sistema de numeração de Kabat; no qual X1 é selecionado de Y e S; no qual X2 é selecionado de Y e S; no qual X3 é selecionado de Y e S; no qual X4 é selecionado de Y e S; no qual X5 é selecionado de Y e S, ou não está presente; no qual X6 é selecionado de Y e S, ou não está presente; no qual X7 é selecionado de P e L; no qual X8 é selecionado de F, L, I, e V.

88 MÉTODO, de acordo com uma das reivindicações de 85 a 86, caracterizado pelo fato de que o método compreende em:

(b) produzir uma variedade de polipeptídeos que inclui:

(i) CDKL1 compreendendo uma primeira seqüência consenso hipervariável ou variante desta contendo a substituição em uma ou mais posições comparada a seqüência consenso hipervariável correspondente;

(ii) CDRL2 compreendendo uma segunda seqüência consenso hipervariável ou variante desta contendo a substituição em uma ou mais posições comparada a seqüência consenso hipervariável correspondente; e

(iii) CDRL3 compreendendo uma seqüência de aminoácido: Q-Q-X1-X2-X3-X4-P-X5-T, no qual X1 é posição 91 de acordo com o sistema de numeração de Kabat; no qual X1 é selecionado de Y e S; no qual X2 é selecionado de Y e S; no qual X3 é selecionado de Y e S; no qual X4 é selecionado de Y e S; no qual X5 é selecionado de Y e S.

89 MÉTODO, de acordo com a reivindicação 85 ou 86, caracterizado pelo fato de que o método compreende em:

(b) produzir uma variedade de polipeptídeos que inclui:

(i) CDRL1 compreendendo uma primeira seqüência consenso hipervariável ou variante desta contendo a substituição em uma ou mais posições comparada a seqüência consenso hipervariável correspondente;

(ii) CDRL2 compreendendo uma segunda seqüência consenso hipervariável ou variante desta contendo a substituição em uma ou mais posições comparada a seqüência consenso hipervariável correspondente; e

(iii) CDRL3 compreende uma seqüência de aminoácidos: Q-Q-F-X1-I-X2-X3-X4-X5-I-H, caracterizado pelo fato de que G é posição 26 e X1 é posição 28 de acordo com o sistema de numeração de Kabat; no qual os aminoácidos em cada uma das posições de X1-X5 são selecionados de S e um dentre Y, W, R e F;

90 MÉTODO PARA GERAR UMA COMPOSIÇÃO, que inclui uma variedade de polipeptídeos que compreende em:

(a) produzir uma variedade de polipeptídeos que inclui:

(i) CDRH1 compreende uma seqüência de aminoácidos: G-F-X1-I-X2-X3-X4-X5-I-H, caracterizado pelo fato de que G é posição 26 e X1 é posição 28 de acordo com o sistema de numeração de Kabat; no qual o aminoácido X1 é selecionado de Y e S; X2 é selecionado de Y e S; X3 é selecionado de Y e S; X4 é selecionado de Y e S; e X5 é selecionado de Y e S;

(ii) CDRH2 compreende uma seqüência de aminoácidos: X1-I-X2-P-X3-X4-G-X5-T-X6-Y-A-D-S-V-K-G, caracterizado pelo fato de que X1 é posição 50 de acordo com o sistema de numeração de Kabat ; no qual o aminoácido X1 é selecionado de Y e S; X2 é selecionado de Y e S; X3 é selecionado de Y e S; X4 é selecionado de Y e S; X5 é selecionado de Y e S; e X6 é selecionado de Y e S. e

(iii) CDRH3 compreende uma seqüência de aminoácidos: X1-X2-X3-X4-X5-X6-X7-X8-X9-X10-X11-X12-X13-X14-X15-X16-X17-X18-X19-D-Y, caracterizado pelo fato de que X1 é posição 95 de acordo com o sistema de numeração de Kabat, no qual os aminoácidos em cada uma das posições de X1-X6 são selecionados de um *pool* de aminoácidos em uma relação molar de 50% de Y, 25% de S e 25% de G, e X18 é selecionado de G e A, e X19 é selecionado de I, M, L, e F.

91 MÉTODO PARA GERAR UMA COMPOSIÇÃO, que inclui uma variedade de polipeptídeos que compreende em:

(a) produzir uma variedade de polipeptídeos que inclui:

(i) CDRH1 compreende uma seqüência de aminoácidos: G-F-X1-I-X2-X3-X4-X5-I-H, caracterizado pelo fato de que G é posição 26 e X1 é posição 28 de acordo com o sistema de numeração de Kabat; no qual o aminoácido X1 é selecionado de Y e S; X2 é selecionado de Y e S; X3 é selecionado de Y e S; X4 é selecionado de Y e S; e X5 é selecionado de Y e S;

(ii) CDRH2 compreende uma seqüência de aminoácidos: X1-I-

X2-P-X3-X4-G-X5-T-X6-Y-A-D-S-V-K-G, caracterizado pelo fato de que X1 é posição 50 de acordo com o sistema de numeração de Kabat ; no qual o aminoácido X1 é selecionado de Y e S; X2 é selecionado de Y e S; X3 é selecionado de Y e S; X4 é selecionado de Y e S; X5 é selecionado de Y e S; e X6 é selecionado de Y e S; e

(iii) CDRH3 compreende uma seqüência de aminoácidos: X1-X2-X3-X4-X5-X6-X7-X8-X9-X10-X11-X12-X13-X14-X15-X16-X17-X18-X19-D-Y, no qual X1 é posição 95 de acordo com o sistema de numeração de Kabat, caracterizada pelo fato dos aminoácidos em cada uma das posições de X1-X6 serem selecionados de um *pool* de aminoácidos numa razão molar de 25% de Y, 50% de S, e 25% de R; no qual os aminoácidos em cada uma das posições de X7-X17 serem selecionados de um *pool* de aminoácidos numa razão molar de 25% de Y, 50% de S e 25% de R, ou não estarem presentes; no qual X18 é selecionado de G e A, e no qual X19 é selecionado de I, M, L e F.

92 MÉTODO PARA GERAR UMA COMPOSIÇÃO, que inclui uma variedade de polipeptídeos que compreende em:

(a) produzir uma variedade de polipeptídeos que inclui:

(i) CDRH1 compreende uma seqüência de aminoácidos: G-F-X1-I-X2-X3-X4-X5-I-H, caracterizado pelo fato de que G é posição 26 e X1 é posição 28 de acordo com o sistema de numeração de Kabat; no qual o aminoácido X1 é selecionado de Y e S; X2 é selecionado de Y e S; X3 é selecionado de Y e S; X4 é selecionado de Y e S; e X5 é selecionado de Y e S;

(ii) CDRH2 compreende uma seqüência de aminoácidos: X1-I-X2-P-X3-X4-G-X5-T-X6-Y-A-D-S-V-K-G, caracterizado pelo fato de que X1 é posição 50 de acordo com o sistema de numeração de Kabat ; no qual o aminoácido X1 é selecionado de Y e S; X2 é selecionado de Y e S; X3 é selecionado de Y e S; X4 é selecionado de Y e S; X5 é selecionado de Y e S; e X6 é selecionado de Y e S. e .

(iii) CDRH3 compreende uma seqüência de aminoácidos: X1-X2-X3-X4-X5-X6-X7-X8-X9-X10-X11-X12-X13-X14-X15-X16-X17-X18-X19-D-Y (SEQ ID No ED: 27), no qual X1 é posição 95 de acordo com o sistema de numeração de Kabat, caracterizada pelo fato dos aminoácidos em cada uma das posições de X1-X6 serem selecionados de um *pool* de aminoácidos numa razão molar de 38% de Y, 25% de S, e 25% de G e 12% de R; caracterizada pelo fato dos aminoácidos em cada uma das posições de X7-X17 serem selecionados de um *pool* de aminoácidos numa razão molar de 38% de Y, 25% de S, e 25% de G e 12% de R, ou não estarem presentes; no qual X18 é selecionado de G e A, e no qual X19 é selecionado de I, M, L e F.

93 MÉTODO PARA GERAR UMA COMPOSIÇÃO, que inclui uma variedade de polipeptídeos que compreende em:

(a) produzir uma variedade de polipeptídeos que inclui:

(i) CDRH1 compreende uma seqüência de aminoácidos: G-F-X1-I-X2-X3-X4-X5-I-H, caracterizado pelo fato de que G é posição 26 e X1 é posição 28 de acordo com o sistema de numeração de Kabat; no qual o aminoácido X1 é selecionado de Y e S; X2 é selecionado de Y e S; X3 é selecionado de Y e S; X4 é selecionado de Y e S; e X5 é selecionado de Y e S;

(ii) CDRH2 compreende uma seqüência de aminoácidos: X1-I-X2-P-X3-X4-G-X5-T-X6-Y-A-D-S-V-K-G, caracterizado pelo fato de que X1 é posição 50 de acordo com o sistema de numeração de Kabat ; no qual o aminoácido X1 é selecionado de Y e S; X2 é selecionado de Y e S; X3 é selecionado de Y e S; X4 é selecionado de Y e S; X5 é selecionado de Y e S; e X6 é selecionado de Y e S. e

(iii) CDRH3 compreende uma seqüência de aminoácidos: X1-X2-X3-X4-X5-X6-X7-X8-X9-X10-X11-X12-X13-X14-X15-X16-X17-X18-X19-D-Y (SEQ ID No ED: 28), no qual X1 é posição 95 de acordo com o sistema de numeração de Kabat, caracterizada pelo fato dos aminoácidos em cada uma

das posições de X1-X6 serem selecionados de um *pool* de aminoácidos numa razão molar de 20% de Y, 26% de S, 26% de G, 13% de R, 1% de A, 1% de D, 1% de E, 1% de F, 1% de H, 1% de I, 1% de K, 1% de L, 1% de M, 1% de N, 1% de P, 1% de Q, 1% de T, 1% de V e 1% de W; caracterizada pelo fato dos aminoácidos em cada uma das posições de X7-X17 serem selecionados de um *pool* de aminoácidos numa razão molar de 20% de Y, 26% de S, 26% de G, 13% de R, 1% de A, 1% de D, 1% de E, 1% de F, 1% de H, 1% de I, 1% de K, 1% de L, 1% de M, 1% de N, 1% de P, 1% de Q, 1% de T, 1% de V e 1% de W, ou não estão presentes; no qual X18 é selecionado de G e A, e no qual X19 é selecionado de I, M, L e F.

94 MÉTODO, de uma das reivindicações de 90 a 93, caracterizado pelo fato de que o método consta adicionalmente:

(b) da produção de uma variedade de polipeptídeos que inclui:

(i) CDRL1 compreende uma primeira seqüência consenso hipervariável ou variante desta contendo uma substituição em uma ou mais posições, em comparação com a seqüência consenso hipervariável correspondente;

(ii) CDRL2 compreende uma segunda seqüência consenso hipervariável ou variante desta contendo uma substituição em uma ou mais posições, em comparação com a seqüência consenso hipervariável correspondente, e

(iii) CDRL3 compreende a seqüência de aminoácidos Q-Q-X1-X2-X3-X4-P-X5-T, no qual X1 é posição 91 de acordo com a numeração de Kabat e é selecionado de S e Y; no qual, X2 é selecionado de S e Y; no qual, X3 é selecionado de Y e S; no qual, X4 é selecionado de Y e S; no qual, X5 é selecionado de Y e S.

95 MÉTODO, de uma das reivindicações de 87 a 89 ou 94, caracterizado pelo fato de que a primeira seqüência de consenso hipervariável

compreende uma seqüência de consenso CDRL1 Kabat.

96 MÉTODO, de acordo com a reivindicação 95, caracterizado pelo fato de que a primeira seqüência de consenso hipervariável é R-A-S-Q-D-V-N-T-A-V-A (ID SEQ NO: 29).

97 MÉTODO, de uma das reivindicações de 87 a 89 ou 94, caracterizado pelo fato de que a segunda seqüência de consenso hipervariável compreende uma seqüência de consenso CDRL2 Kabat.

98 MÉTODO, de acordo com a reivindicação 97, caracterizado pelo fato de que a segunda seqüência de consenso hipervariável é S-A-S-S-L-Y-S (SEQ ID NO:30).

99 MÉTODO, de uma das reivindicações de 85 a 98, caracterizado pelo fato de que a variedade de polipeptídeos são codificados por uma variedade de polinucleotídeos.

100 MÉTODO PARA A SELEÇÃO DE UM DOMÍNIO VARIÁVEL LIGANTE AO ANTÍGENO, que se liga a um antígeno alvo a partir de uma biblioteca de domínios variáveis de anticorpos, compreendendo na:

(a) interação da biblioteca da reivindicação 84 com o antígeno alvo;

(b) separação de um ou mais polipeptídeos que ligam especificamente ao antígeno alvo dos polipeptídeos que não se ligam especificamente ao antígeno alvo, recuperando um ou mais polipeptídeos que se ligam especificamente ao antígeno alvo e incubando um ou mais polipeptídeos que se ligam especificamente ao antígeno alvo em uma série de soluções que consiste em diminuir a quantidade de antígeno alvo a uma concentração de cerca de 0,1 nM a cerca de 1000 nN, e

(c) Seleção de um ou mais polipeptídeos que se ligam especificamente ao antígeno alvo e que podem ligar-se a uma baixa concentração de antígeno alvo ou que possuem uma afinidade de cerca de 0,1

nM a 200 nM.

101 MÉTODO, de acordo com a reivindicação 100, caracterizado pelo fato de que o antígeno é HER2 ou DR5.

102 MÉTODO, de acordo com a reivindicação 100, caracterizado pelo fato da concentração do antígeno alvo ser cerca de 100 a 250 nM.

103 MÉTODO, de acordo com a reivindicação 100, caracterizado pelo fato da concentração do antígeno alvo ser cerca de 25 a 100 nM.

104 MÉTODO PARA SELECIONAR POLIPEPTÍDEOS, que se ligam a antígenos alvos de uma biblioteca de polipeptídeos, compreendendo em:

(a) isolar um ou mais polipeptídeos que ligam-se especificamente ao antígeno alvo pela interação à uma biblioteca que contenha uma variedade de polipeptídeos de uma das reivindicações de 1 a 79 com um antígeno alvo imobilizado sob condições adequadas para a ligação;

(b) separar um ou mais polipeptídeos que ligam-se especificamente ao antígeno alvo dos polipeptídeos que não se ligam especificamente ao antígeno alvo, e recuperar um ou mais polipeptídeos que se ligam especificamente ao antígeno alvo para obter uma subpopulação enriquecida para um ou mais polipeptídeos que se ligam especificamente ao antígeno alvo; e

(c) opcionalmente, repetir as etapas (a) - (b) pelo menos duas vezes, cada repetição usando a subpopulação enriquecida para a um ou mais polipeptídeos que ligam especificamente ao antígeno alvo obtido a partir do último ciclo de seleção.

105 MÉTODO, de acordo com a reivindicação 104, compreendendo adicionalmente em:

(d) incubar a subpopulação com uma concentração de antígeno alvo marcado em um intervalo de cerca de 0,1 nM a 1000 nN para formar uma mistura, sob condições adequadas para ligação;

(e) interagir a mistura com um agente imobilizado que se liga no antígeno alvo marcado;

(f) detectar a um ou mais polipeptídeos que ligam-se especificamente ao antígeno alvo marcado, e recuperar um ou mais polipeptídeos que liga-se especificamente ao antígeno alvo marcado do antígeno alvo marcado; e

(g) opcionalmente, repetir as etapas de (d) a (f) por pelo menos duas vezes, cada repetição usando a subpopulação enriquecida para um ou mais polipeptídeos que ligam-se especificamente ao antígeno alvo marcado obtido a partir do última ciclo de seleção, utilizando uma concentração menor de antígeno alvo marcado do que no ciclo de seleção anterior.

106 MÉTODO, de acordo com a reivindicação 105, compreendendo ainda da adição de um excesso de antígeno alvo não marcado na mistura e incubar a mistura por um período de tempo suficiente para recuperar um ou mais polipeptídeos que se ligam especificamente ao antígeno alvo com baixa afinidade.

107 MÉTODO PARA ISOLAR UM OU MAIS POLIPEPTÍDEOS, que se ligam especificamente a um antígeno alvo com alta afinidade, compreendendo em:

(a) Interagir uma biblioteca que consiste em uma variedade de polipeptídeos de uma das reivindicações de 1 a 79 com um antígeno alvo a uma concentração de, pelo menos, 0,1 nM a 1000 nN para isolar um ou mais polipeptídeos que se ligam especificamente ao antígeno alvo;

(b) recuperar um ou mais polipeptídeos que ligam especificamente ao antígeno alvo a partir do antígeno alvo para obter uma subpopulação enriquecida para uma ou mais polipeptídeos que se ligam especificamente ao antígeno alvo; e

(c) opcionalmente repetir as etapas (a) e (b) por pelo menos

duas vezes, cada repetição usando a subpopulação obtidos a partir da última etapa de e usando uma concentração decrescente de antígeno alvo do que utilizada na etapa anterior para isolar um ou mais polipeptídeos que se ligam especificamente ao antígeno alvo em uma concentração menor de antígeno alvo.

108 MÉTODO PARA O TRATAMENTO DE CÂNCER, em um mamífero, compreendendo em administrar um polipeptídeo de uma das reivindicações de 1 a 79 aos mamíferos.

109 MÉTODO, de acordo com a reivindicação 108, caracterizado pelo fato do câncer ser selecionado de câncer de mama, câncer coloretal, câncer de pulmão de não-pequenas células, linfoma não-Hodgkin (NHL), câncer renal, câncer de próstata, câncer de fígado, câncer de cabeça e pescoço, melanoma, câncer de ovário, mesotelioma e mieloma múltiplo.

110 MÉTODO, de acordo com a reivindicação 108 ou 109, caracterizado pelo fato de que o anticorpo é um anticorpo anti-HER2.

111 MÉTODO, de acordo com a reivindicação 108 ou 109, caracterizado pelo fato de que o anticorpo é um anticorpo anti-DR5.

112 MÉTODO, de acordo com uma das reivindicações de 108 a 111, caracterizado pelo fato de que o tratamento inclui a etapa adicional de administração de um segundo agente terapêutico simultaneamente ou seqüencialmente com o anticorpo.

113 MÉTODO, de acordo com a reivindicação 112, caracterizado pelo fato de que o segundo agente terapêutico é selecionado de um agente antiangiogênico, antineoplásico, agente quimioterápico e agente citotóxico.

114 MÉTODO, de acordo com a reivindicação 113, caracterizado pelo fato de que o agente antiangiogênico é um anticorpo anti-hVEGF.

115 MÉTODO PARA TRATAR, um mamífero que sofre ou

possui risco de desenvolver uma doença inflamatória ou autoimune, compreendendo a etapa de tratamento do mamífero com um anticorpo de uma das reivindicações de 1 a17.

116 MÉTODO, de acordo com a reivindicação 115, caracterizado pelo fato de que a doença inflamatória ou autoimune é artrite reumatóide.

117 MÉTODO, de acordo com a reivindicação 115 ou 116, caracterizado pelo fato de que o anticorpo é um anticorpo anti-DR5.

RESUMO

"POLIPEPTÍDEOS, ANTICORPO, POLIPEPTÍDEO DE FUSÃO, COMPOSIÇÃO, POLINUCLEOTÍDEO, VETOR, CÉLULA HOSPEDEIRA, MÉTODO DE PRODUÇÃO DE UM POLIPEPTÍDEO, BIBLIOTECA DE POLIPEPTÍDEOS, MÉTODOS PARA GERAR UMA COMPOSIÇÃO, MÉTODO PARA A SELEÇÃO DE UM DOMÍNIO VARIÁVEL LIGANTE AO ANTÍGENO, MÉTODO PARA SELECIONAR POLIPEPTÍDEOS, MÉTODO PARA ISOLAR UM OU MAIS POLIPEPTÍDEOS, MÉTODO PARA O TRATAMENTO DE CÂNCER E MÉTODO PARA TRATAR"

A invenção fornece anticorpos ou fragmentos destes ligantes ao antígeno para DR5 e HER-2. Os anticorpos e/ou fragmentos destes ligantes ao antígeno consistem de variantes de CDR que compreende uma diversidade de seqüências de aminoácidos altamente restritas. A invenção fornece também estes polipeptídeos como polipeptídeos de fusão para polipeptídeos heterólogos, tais como, pelo menos uma porção do fago ou proteínas da cápside viral, marcadores e ligantes. Além disso, fornece composições e métodos de utilização para o tratamento do câncer e de doenças autoimunes relacionadas.