

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

(21) **PI0710011-6 A2**

(22) Data de Depósito: 13/04/2007
(43) Data da Publicação: 02/08/2011
(RPI 2117)



(51) *Int.Cl.:*
C07K 16/00 2006.01
C12P 21/08 2006.01
C07K 1/00 2006.01

(54) Título: **PROTEÍNAS DE LIGAÇÃO
COMPREENDENDO ARTICULAÇÃO DE
IMUNOGLOBULINA E REGIÕES FC DOTADAS DE
FUNÇÕES EFETORAS FC ALTERADAS**

(30) Prioridade Unionista: 14/04/2006 US 60/744.899,
13/04/2007 US Não Disponível, 13/04/2007 US Não Disponível,
14/04/2006 US 60/744.899

(73) Titular(es): Trubion Pharmaceuticals, Inc.

(72) Inventor(es): Erik Stephen Espling, Peter Armstrong
Thompson, Peter Robert Baum, Phillip Tan

(74) Procurador(es): Nellie Anne Daniel-shores

(86) Pedido Internacional: PCT US2007066634 de 13/04/2007

(87) Publicação Internacional: WO 2007/121354 de 25/10/2007

(57) Resumo: PROTEÍNAS DE LIGAÇÃO COMPREENDENDO ARTICULAÇÃO DE IMUNOGLOBULINA E REGIÕES FC DOTADAS DE FUNÇÕES EFETORAS FC ALTERADAS A presente invenção proporciona proteínas de ligação compreendendo um ou mais domínio CH2 e/ou CH3 de região de articulação Fc de imunoglobulina onde um ou mais domínios CH2 e/ou CH3 de região constante e/ou articulação é modificado para alterar a afinidade e/ou especificidade de ligação da proteína de ligação para um receptor cognato (por exemplo, um Receptor Fc) e/ou para proporcionar uma ou mais novas especificidades de ligação a região de articulação e/ou constante que a imunoglobulina não modificada correspondente não possui (por exemplo, afinidade para classe distinta de receptor cognato distinto da classe de receptor cognato ao qual a proteína de ligação não modificada se liga especificamente). As proteínas de ligação de acordo com a presente invenção incluem, por exemplo, anticorpos modificados, fragmentos de anticorpos, proteínas de ligação recombinantes, e proteínas de fusão de domínio imunoglobulina de ligação trabalhadas molecularmente por engenharia, incluindo os produtos imunofarmacêuticos modulares pequenos (produtos SMIPTM).

"PROTEÍNAS DE LIGAÇÃO COMPREENDENDO ARTICULAÇÃO DE IMUNOGLOBULINA E REGIÕES FC DOTADAS DE FUNÇÕES EFETORAS FC ALTERADAS"

Referência cruzada aos pedidos relacionados

5 O presente pedido reivindica os benefícios do pedido provisório de patente U.S. No. 60/744,899, depositado em 14 de Abril de 2006, os benefícios da data de depósito anterior do qual está aqui reivindicada sob 35 U.S.C. § 119 (e) e adicionalmente aqui incorporado por referência.

Antecedentes da Invenção

10 Campo Técnico da Invenção

A presente invenção se refere em geral aos campos de imunologia, química de proteína, e biologia molecular. Mais especificamente, aqui proporcionadas estão proteínas de ligação que compreendem uma ou mais articulação de imunoglobulina, domínio CH2 e/ou CH3, onde uma ou mais articulações do domínio CH2 e/ou CH3 é modificada para
15 alterar a afinidade de ligação de proteína de ligação e/ou a especificidade para um receptor cognato (por exemplo, um receptor Fc), e/ou proporcionar uma ou mais novas especificidades de ligação à articulação e/ou região constante que a proteína de ligação não modificada correspondente não possui (por exemplo, afinidade para o receptor Fc distinto a partir do(s) receptor(es) cognato(s) ao qual a proteína de ligação não modificada
20 especificamente se liga). As proteínas de ligação de acordo com a presente invenção incluem, por exemplo, anticorpos modificados, fragmentos de anticorpos, proteínas de ligação recombinantes, e proteínas de fusão de ligação de domínio imunoglobulina trabalhadas molecularmente por engenharia, incluindo pequenos produtos imunofarmacêuticos modulares (produtos SMIP™).

25 Descrição da técnica relacionada

Uma imunoglobulina é uma proteína multimérica composta de dois polipeptídeos de cadeia leve idênticos e dois polipeptídeos de cadeia pesada idênticos (H2L2) que são unidos em um complexo macromolecular por ligações de dissulfeto de intercadeia. As ligações de dissulfeto de intercadeia unem diferentes áreas da mesma cadeia de
30 polipeptídeo resultando na formação de alças as quais, junto com os amino ácidos adjacentes, constituem os domínios de imunoglobulina.

Na porção amino terminal, cada cadeia leve e cada cadeia pesada apresenta uma única região variável que mostra uma variação considerável na composição do amino ácido a partir de um anticorpo para outro. A região variável de cadeia leve, V_L, se associa com a
35 região variável da cadeia pesada, V_H, para formar um campo de ligação de antígeno da imunoglobulina, F_V. As cadeias leves apresentam um domínio de região constante simples (CH1) e as cadeias pesadas apresentam diversos domínios de região constante. As classes

IgG, IgA, e IgD são dotadas de três domínios de região constante de cadeia pesada, os quais são designados CH1, CH2, e CH3; e as classes IgM e IgE são dotadas de quatro domínios de região constante de cadeia pesada, CH1, CH2, CH3, e CH4. A estrutura e a função da imunoglobulina são revistas em in Harlow *et al.*, Eds., "Antibodies: A Laboratory Manual," Chapter 14 (Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, 1988) e em Lo, Ed., "Antibody Engineering: Methods and Protocols," Part 1 (Humana Press, Totowa, New Jersey, 2004).

As cadeias pesadas das imunoglobulinas podem ser divididas em tres regiões funcionais: a região Fd, a região de articulação, e a região Fc (fragmento cristalizável). A região Fd compreende os domínios VH e CH1 e, em combinação com a cadeia leve, forma Fab – o fragmento de ligação a antígeno. O fragmento Fc é responsável pelas funções efectoras da imunoglobulina, as quais incluem, por exemplo, a fixação de complemento e a ligação aos receptores Fc cognatos das células efectoras. A região de articulação, encontrada nas classes de imunoglobulinas IgG, IgA e IgD, atua como um espaçador flexível que permite que a porção Fab se mova livremente no espaço com relação à região Fc. Diferente das regiões constantes, os domínios de articulação são estruturalmente diversos, variando tanto em seqüência quanto em comprimento entre as classes e subclasses de imunoglobulinas.

De acordo com estudos cristalográficos, a região de articulação de imunoglobulina pode ser adicionalmente subdividida estruturalmente e funcionalmente em três regiões: a articulação superior, o núcleo, e a articulação inferior. Shin *et al.*, *Immunological Reviews* 130:87 (1992). A articulação superior inclui aacs da extremidade carboxila de CH1 para o primeiro resíduo na articulação que restringe o movimento, em geral o primeiro resíduo de cisteína que forma uma ligação dissulfeto intercadeia entre as duas cadeias pesadas. O comprimento da região de articulação superior se correlaciona com a flexibilidade segmental do anticorpo. A região de articulação do núcleo contém pontes de dissulfeto de intercadeia pesada. A região de articulação inferior une a extremidade amino terminal de, e inclui um resíduo no domínio CH2. *Id.*

A região de articulação do núcleo IgG1 contém a seqüência Cys-Pro-Pro-Cys que quando dimerizado pela formação de ligação dissulfeto, resulta em um octapeptídeo cíclico o qual se acredita agir como um pivô, conferindo assim flexibilidade. As mudanças conformacionais permitidas pela estrutura e a flexibilidade da seqüência de polipeptídeo da região de articulação de imunoglobulina pode afetar as funções efectoras da porção Fc do anticorpo.

Três categorias gerais de funções efectoras associadas com a região Fc incluem (1) a ativação da cascata clássica de complemento, (2) a interação com as células efectoras, e (3) a compartimentalização das imunoglobulinas. As subclasses de IgG humano diferentes

variam com relação às eficácias com as quais as mesmas fixam o complemento, ou ativam e amplificam as etapas da cascata de complemento (ver, por exemplo, Kirschfink, *Immunol. Rev.* 180:177 (2001); Chakraborti *et al.*, *Cell Signal* 12:607 (2000); Kohl *et al.*, *Mol. Immunol.* 36:893 (1999); Marsh *et al.*, *Curr. Opin. Nephrol. Hypertens.* 8:557 (1999); e Speth *et al.*, *Wien Klin. Wochenschr.* 111:378 (1999)). Acredita-se que a citotoxicidade complemento-dependente (CDC) seja um mecanismo significativo para a depuração de células alvo específicas tais como células de tumor. Em geral IgG1 e IgG3 mais eficientemente fixam o complemento, IgG2 é menos eficaz, e IgG4 não ativa o complemento. A ativação do complemento é iniciada pela ligação de C1q, uma subunidade do primeiro componente C1 na cascata, ao complexo de antígeno-anticorpo.

Embora o campo de ligação para C1q seja localizado no domínio CH2 do anticorpo, a região de articulação influencia a capacidade o anticorpo para ativar a cascata. Por exemplo, as imunoglobulinas que estão faltando de uma região de articulação são incapazes de ativar o complemento. Shin *et al.*, (1992), *supra*. Sem a flexibilidade conferida pela região de articulação, a porção Fab do anticorpo ligado ao antígeno pode não ser capaz de adotar a conformação necessária para permitir que C1q se ligue a CH2. (ver *Id.*) o comprimento da articulação e a flexibilidade segmental correlata, a uma extensão limitada, com a ativação de complemento. Assim, as moléculas IgG3 humanas com regiões de articulação alterada são rígidas como as regiões de articulação IgG4, permanecem eficazes na ativação da cascata de complemento.

A região de articulação pode ainda conter um ou mais campo(s) de glicosilação, que inclui uma série de tipos estruturalmente distintos de campos para a fixação de carboidratos. Por exemplo, o IgA1 contém cinco campos de glicosilação dentro de um segmento de 17 amino ácidos da região de articulação, conferindo resistência excepcional ao polipeptídeo de região de articulação para proteases intestinais, considerada uma propriedade vantajosa para a imunoglobulina secretória.

A ausência de uma região de articulação, ou a falta de uma região de articulação funcional, pode ainda afetar a habilidade de determinadas imunoglobulinas humanas a se ligar a receptores Fc em células efetoras imunes. A ligação de uma imunoglobulina ao receptor Fc facilita a citotoxicidade mediada a célula anticorpo dependente (ADCC), o que se presume ser um mecanismo importante para a eliminação de células tumorais. A família do receptor Fc IgG humano (FcR) é dividida em três grupos, FcγRI (CD64), que é capaz de se ligar a IgG com alta afinidade, e FcγRII (CD32) e FcγRIII (CD16), ambos os quais são receptores de baixa afinidade. O receptor Fc IgA humano é FcαR (CD89). A evidência experimental indica que os resíduos na região proximal de articulação do domínio CH2 são importantes para a especificidade da interação entre uma imunoglobulina e cada um dos receptores Fc respectivos. Isto é suportado pela observação de que proteínas de mieloma

IgG1 e os anticorpos quiméricos IgG3 recombinantes que faltam de uma região de articulação são incapazes de se ligar a FcγRI, provavelmente em função da reduzida acessibilidade ao domínio CH2. Shin *et al.*, *Intern. Rev. Immunol.* **10**:177, 178 - 79 (1993). Os Fcγ-receptores são em geral revistos em Ingmar *et al.*, "Humano IgG Fc Receptors," *Intern. Rev. Immunol.* **16**:29 - 55 (1997) e Ravetch and Bolland, "IgG Fc Receptors," *Annu. Rev. Immunol.* **19**:275 - 90 (2001). Ver também, Getahun *et al.*, *J. Immunol.* **172**:5269 - 5276 (2004).

FcγRI (CD64) é expresso em macrófagos e células dendríticas e desempenha um papel na fagocitose, surto respiratório, estimulação de citocina, e transporte endocítico de célula dendrítica. A expressão de FcγRI é regulada a maior tanto por GM-CSF e γ-interferon (γ-IFN) e regulada a menor por interleucina-4 (IL-4). Quando todos os receptores de ativação são nocauteados, os ratos são protegidos contra inflamação mediada a complexo imune. Similarmente, quando FcγRI é nocauteado, os ratos são proporcionados com alguma proteção.

Três formas de FcγRII (CD32) foram identificados, FcγRIIa, FcγRIIb, e FcγRIIc. FcγRIIa é expresso em leucócitos polimorfonucleares (PMN), macrófagos, células dendríticas, e células mastócitos. FcγRIIa desempenha um papel na fagocitose, surto respiratório, e estimulação de citocina. A expressão de FcγRIIa é regulada a maior por GM-CSF e γ-IFN, e reduzida por IL-4. Quando todos os receptores de ativação são nocauteados, os ratos são protegidos contra inflamação mediada a complexo imune. FcγRIIa se liga ao polimorfo H131 (CRP) protina c-reativa com alta afinidade e ao polimorfo CRP R131 com baixa afinidade. A distribuição de polimorfismos na população geral é de aproximadamente 50:50 de R131 associada com um aumento na susceptibilidade para infecção e lúpus nefrite. A FcγRIIb é expressa em células B, PMN, macrófagos, e células mastócitos. O FcγRIIb inibe as respostas mediadas por motivo de ativação com base em tirosina imunoreceptor (ITAM); assim, este é um receptor inibitório. A expressão de FcγRIIc é regulada a maior pela imunoglobulina intravenosa (IVIG) e IL-4 e reduzida por γ-IFN. Ratos com FcγRIIb nocauteados exibem respostas de anticorpo aumentadas e susceptibilidade a doença auto-imune e resposta de recall de célula B diminuída quando as células dendríticas foliculares (FDC) são nocauteadas por CD32. FcγRIIc é expressa em células NK mas a sua função e regulação da expressão são pobremente entendidos.

Duas formas de FcγRIII (CD16) foram identificadas, FcγRIIIa e FcγRIIIb. FcγRIIIa é expressa em células exterminadoras naturais (NK), macrófagos, células mastócitos, e plaquetas. O referido receptor participa na fagocitose, surto respiratório, estimulação de citocina, agregação plaquetária e desgranulação, e ADCC NK-mediada. A expressão de FcγRIII é regulada a maior por C5a, TGFβ, e γ-IFN e regulada a menor por IL-4. Quando todos os receptores de ativação são nocauteados, os ratos estão protegidos contra

inflamação mediada a complexo imune. FcγRIIIa é polimórfico com F176 sendo o mais comum e V-176 sendo o menos comum. F-176 se liga com menos avidéz ao IgG e está associado com lúpus eritematoso. FcγRIIIb é um receptor ligado a GPI expresso em PMN. Uma deficiência herdada de FcγRIIIb existe e não apresenta fenótipo conhecido. Um polimorfismo FcγRIIIb NA1/NA2 é importante em neutropenia isoimune.

A tecnologia de anticorpos monoclonais e os métodos de engenharia genética conduziram a um rápido desenvolvimento de moléculas de imunoglobulina para a diagnose e o tratamento das doenças humanas. A engenharia de proteínas foi aplicada para aprimorar a afinidade de um anticorpo para o seu antígeno cognato, para reduzir os problemas relacionados a imunogenicidade de polipeptídeos recombinantes administrados, e para alterar as funções efetoras de anticorpo. A estrutura de domínio das imunoglobulinas é receptiva a engenharia recombinante, no sentido de que os domínios de ligação de antígeno e os domínios que conferem as funções efetoras podem ser trocados entre as classes de imunoglobulinas (por exemplo, IgG, IgA, e IgE) e subclasses (*por exemplo*, IgG₁, IgG₂, IgG₃, e IgG₄, *etc.*).

Ademais, moléculas de imunoglobulinas menores foram construídas para superar os problemas associados com a terapia de imunoglobulina total. Por exemplo, polipeptídeos de fragmento de região variável de imunoglobulina de cadeia simples (ScFv) compreende um domínio variável de cadeia pesada de imunoglobulina unido por meio de um peptídeo de curta ligação a um domínio variável de cadeia leve de imunoglobulina. Huston *et al.* *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 85:5879-83 (1988). Em virtude do pequeno tamanho de moléculas scFv, as mesmas exibem uma depuração muito rápida a partir de plasma e tecidos e são capazes de penetração mais eficaz nos tecidos do que as imunoglobulinas totais. Ver, por exemplo, Jain, *Cancer Res.* 50:814s-819s (1990). Um scFv anti-tumor mostrou uma penetração de tumor mais rápida e uma distribuição mais rápida através da massa tumoral do que o anticorpo quimérico correspondente. Yokota *et al.*, *Cancer Res.* 52:3402-08 (1992). A fusão de um scFv a outra molécula, tal como uma toxina, leva vantagem da atividade de ligação específica a antígeno e do pequeno tamanho de scFv para enviar a toxina ao tecido alvo. Chaudary *et al.*, *Nature* 339:394 (1989) and Batra *et al.*, *Mol. Cell. Biol.* 11:2200 (1991).

Apesar das vantagens que as moléculas scFv trazem a soroterapia, existem diversos inconvenientes com relação a esta abordagem terapêutica. Embora uma rápida depuração de scFv possa reduzir os efeitos tóxicos em células normais, a referida rápida depuração pode evitar o envio de uma dose eficaz mínima ao tecido alvo. As quantidades de fabricação adequadas de scFv para a administração em pacientes tem sido um desafio em virtude das dificuldades na expressão e no isolamento de scFv que afeta adversamente o rendimento. Durante a expressão, as moléculas scFv faltam de estabilidade e com freqüência se agregam em virtude do pareamento de regiões variáveis a partir de diferentes

moléculas. Ademais, os níveis de produção de moléculas scFv em sistemas de expressão de mamíferos são baixos, limitando o potencial para a fabricação eficiente de moléculas scFv para terapia. Davis *et al.*, *J. Biol. Chem.* 265:10410-18 (1990) and Traunecker *et al.*, *EMBO J.* 10:3655-59 (1991). Estratégias para o aprimoramento da produção têm sido exploradas, incluindo a adição de campos de glicosilação às regiões variáveis. Ver, por exemplo, U.S. Pat. No. 5,888,773 e Jost *et al.*, *J. Biol. Chem.* 269:26267-73 (1994).

Uma desvantagem adicional de usar scFv para a terapia é a falta de funções efectoras. Um scFv que falta de funções citolíticas, ADCC e de citotoxicidade dependente de complemento (CDC), que são tipicamente associadas às regiões constantes de imunoglobulina, podem ser ineficazes para o tratamento da doença. Embora o desenvolvimento da tecnologia scFv tenha se iniciado aproximadamente a duas décadas, atualmente nenhum produto scFv é aprovado para terapia. A conjugação ou a fusão de toxinas em scFv tem sido assim uma estratégia alternativa para proporcionar uma molécula específica a antígeno, potente, mas a dosagem com os referidos conjugados ou quimeras com frequência é limitada pela toxicidade excessiva e/ou não específica tendo como sua origem a fração de toxina das referidas preparações. Os efeitos tóxicos podem incluir a elevação suprafisiológica das enzimas do fígado e a síndrome de vazamento vascular, e outros efeitos indesejados. Ademais, as imunotoxinas são em si altamente imunogênicas após serem administradas a um hospedeiro, e os anticorpos do hospedeiro gerados contra a imunotoxina limitam sua utilidade potencial em tratamentos terapêuticos repetidos de um indivíduo.

Os benefícios das funções efectoras associadas a região constante de imunoglobulina no tratamento de doença acarretou no desenvolvimento de proteínas de fusão nas quais as seqüências de polipeptídeo de região constante de imunoglobulina são presentes e de seqüências de não imunoglobulina são substituídas pela região variável de anticorpo. Por exemplo, CD4, a proteína de superfície de célula T reconhecida pelo HIV foi recombinantemente fundida a um domínio efector Fc de imunoglobulina. Ver, Sensel *et al.*, *Chem. Immunol.* 65:129-158 (1997). A atividade biológica da referida molécula depende, em parte, na classe ou na subclasse da região constante escolhida. Uma proteína de fusão IL-2-IgG₁, por exemplo, efetua a lise mediada a complemento de células que portam o receptor IL-2. Ver Id. O uso de regiões constantes de imunoglobulina para construir as referidas e outras proteínas de fusão pode também conferir propriedades farmacocinéticas aprimoradas.

Permanece ainda uma necessidade não alcançada na técnica para proteínas de ligação derivadas de imunoglobulina aprimoradas onde a articulação e/ou o domínio Fc sejam modificados para alterar uma ou mais funções efectoras tais como afinidade e/ou especificidade de ligação a receptor Fc alterada (e ADCC associada), meia vida de proteína

de ligação in vivo, e/ou fixação de complemento.

Sumário da Invenção

A presente invenção vai de encontro aos referidas e outras necessidades relatadas ao proporcionar, entre outras coisas, proteínas de ligação que compreendem um ou mais domínio(s) CH2, e/ou CH3 de articulação de região constante de imunoglobulina, onde o um ou mais domínio CH2, e/ou CH3 de região constante e/ou articulação é modificado para alterar uma ou mais funções efectoras Fc de proteína de ligação. Exemplificados aqui estão as proteínas onde a articulação de imunoglobulina e/ou região Fc é modificada para alcançar uma afinidade de ligação alterada e/ou especificidade para um receptor cognato (por exemplo, um receptor Fc) e/ou proporcionar uma ou mais novas especificidades de ligação à região Fc que a proteína de ligação não modificada correspondente não possui (por exemplo, afinidade para um ou mais receptor Fc que é distinto do receptor cognato ao qual a proteína de ligação não modificada especificamente se liga).

As proteínas de ligação de acordo com a presente invenção incluem, por exemplo, anticorpos modificados, fragmentos de anticorpos, proteínas de ligação recombinantes, e proteínas de fusão de domínio-imunoglobulina de ligação trabalhadas molecularmente por engenharia, incluindo os produtos imunofarmacêuticos modulares pequenos (produtos SMIP™) onde uma ou mais seqüências de amino ácidos em domínio CH2 e/ou CH3 em uma articulação de imunoglobulina é alterada. Dentro de determinadas modalidades, as proteína de ligação modificadas descritas aqui compreendem mudanças em uma ou mais seqüências de amino ácidos no domínio CH2 e/ou CH3 da articulação que são responsáveis pela afinidade e/ou especificidade de ligação do receptor.

Em um aspecto, a presente invenção proporciona proteínas de ligação, em particular proteínas de ligação que compreendem um ou mais domínios CH2 e/ou CH3 de articulação de cadeia pesada de imunoglobulina, onde a proteína de ligação é modificada de modo que a mesma se liga com afinidade e/ou especificidade de ligação alterada a um ou mais Fc receptores específicos a imunoglobulina.

Exemplificadas aqui estão as proteínas de ligação que compreendem um ou mais domínios CH2 e/ou CH3 de articulação de cadeia pesada de imunoglobulina IgG, onde a proteína de ligação é modificada de tal forma que a mesma se liga com afinidade e/ou especificidade de ligação alterada (isto é, aumentada ou reduzida) a um ou mais receptores Fc específicos a imunoglobulina IgG FcγRI (CD64); FcγRII (CD32), incluindo FcγRIIa, FcγRIIb, e FcγRIIc; e/ou FcγRIII (CD16), incluindo FcγRIIIa e FcγRIIIb. As proteína de ligação deste tipo incluem, por exemplo, proteínas de ligação onde um ou mais amino ácidos são inseridos em e/ou deletados a partir da seqüência de amino ácido primária nas regiões, domínios, voltas, e/ou estruturas de alça responsáveis pela ligação Fcγ-receptor. As referidas mudanças incluem, mas não são limitados a, inserção e/ou deleção de um ou mais

amino ácidos entre e/ou adjacente aos amino ácidos que, com a ligação ao receptor Fc cognato, estão em contato direto com os amino ácidos dentro de um ou mais receptor(es) Fc imunoglobulina-específico(s) incluindo FcγRI (CD64), FcγRII (CD32), e/ou FcγRIII (CD16).

5 As modalidades específicas para os referidos aspectos da presente invenção incluem as proteínas de ligação que compreendem um ou mais domínios CH2 IgG onde o domínio CH2 é um domínio CH2 IgG1 e/ou IgG3. Algumas das referidas modalidades proporcionam proteínas de ligação que compreendem um ou mais amino ácido de deleção a partir de uma amino ácido de inserção dentro de uma estrutura de alça proximal de articulação, L-L-G-G-P, do domínio IgG₁ e/ou IgG₃ CH2. Especificamente exemplificado aqui
10 estão as proteínas de ligação que compreendem inserções simples de um único amino ácido na posição indicada pelo "*" dentro da estrutura de alça proximal de articulação a seguir. Assim, proporcionado aqui estão proteínas de ligação que compreendem as estruturas de alça proximal de articulação modificada L-L-*-G-G-P, L-L-G-*-G-P, e L-L-G-G-
15 *-P. Ainda proporcionado aqui estão as proteínas de ligação que compreendem inserções simples de dois ou mais amino ácidos nas posições indicadas por "*" dentro das estruturas de alça proximais de articulação L-L-*-G-G-P, L-L-G-*-G-P, e L-L-G-G-*-P. Assim, dentro das referidas modalidades, "*" indica a inserção de pelo menos 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, ou 20 amino ácidos. Tipicamente, os amino ácidos adequados
20 para a geração de proteínas de ligação dotadas das referidas estruturas de alça proximais de articulação são selecionadas a partir do grupo que consiste em Ala, Gly, Ile, Leu, e Val.

Outras das referidas modalidades proporcionam proteínas de ligação que compreende um ou mais domínios CH2 IgG onde o domínio CH2 é um domínio CH2 IgG₁, IgG₂, e/ou IgG₃. Algumas das referidas modalidades proporcionam proteínas de ligação que
25 compreendem uma ou mais deleção de amino ácido a partir e/ou inserção de amino ácido de dentro da estrutura de alça BC, D-V-S-H-E, do domínio CH2 IgG₁, IgG₂, e/ou IgG₃. Especificamente exemplificadas aqui estão as proteínas de ligação que compreendem inserções simples de um amino ácido simples nas posições indicadas pelo "*" dentro das estruturas de alça a seguir. Assim, estão proporcionadas aqui as proteínas de ligação que
30 compreendem estruturas de alça BC D-V-*-S-H-E e D-V-S-*-H-E. Também proporcionadas aqui estão as proteínas de ligação que compreendem inserções simples de dois ou mais amino ácidos nas posições indicadas por "*" dentro das estruturas de alça BC D-V-*-S-H-E e D-V-S-*-H-E. Assim, dentro das referidas modalidades, "*" indica a inserção de pelo menos 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, ou 20 amino ácidos. Tipicamente,
35 os amino ácidos adequados para a geração de proteínas de ligação dotadas das referidas estruturas de alça BC modificadas são selecionados a partir do grupo que consiste em Ala, Gly, Ile, Leu, e Val.

Ainda outras modalidades proporcionam proteínas de ligação que compreendem um ou mais domínios CH2 IgG onde o domínio CH2 é um domínio CH2 IgG₁ e/ou IgG₃. Algumas das referidas modalidades proporcionam proteínas de ligação que compreendem uma ou mais deleção de amino ácido a partir de e/ou inserção de amino ácido dentro da

5 estrutura de alça FG, A-L-P-A-P-I, do domínio CH2. Especificamente exemplificadas aqui estão as proteínas de ligação que compreende inserções simples de um amino ácido simples nas posições indicadas pelo "*" dentro da estrutura de alça FC a seguir. Assim, proporcionadas aqui estão as proteínas de ligação que compreende as estruturas de alça FG modificadas A-L*-P-A-P-I, A-L-P*-A-P-I, e A-L-P-A*-P-I. Ainda proporcionadas aqui

10 estão as proteínas de ligação que compreende inserções simples de dois ou mais amino ácidos nas posições indicadas pelo "*" dentro da estrutura de alça FG A-L*-P-A-P-I, A-L-P*-A-P-I, e A-L-P-A*-P-I. Assim, dentro das referidas modalidades, "*" indica a inserção de pelo menos 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, ou 20 amino ácidos. Tipicamente, os amino ácidos adequados para a geração de proteínas de ligação dotadas

15 das referidas estruturas de alça FG modificadas são selecionadas a partir do grupo que consiste em Ala, Gly, Ile, Leu, e Val.

Em um outro aspecto, a presente invenção proporciona proteínas de ligação, em particular proteínas de ligação que compreendem um ou mais domínio CH2 e/ou CH3 de articulação de cadeia pesada, onde a proteína de ligação compreende uma ou mais

20 modificações dentro de um ou mais domínio CH2 e/ou CH3 de articulação de cadeia pesada, onde a modificação compreende a inserção de uma ou mais seqüência(s) de glicosilação N-ligadas e/ou mais seqüência(s) de glicosilação O-ligadas, cuja(s) seqüência(s) de glicosilação é suficiente para alcançar a glicosilação N- e/ou O-ligada na posição de inserção deste modo alterando (isto é, seja aumentando ou diminuindo) a

25 afinidade e/ou especificidade de ligação da proteína de ligação a um ou mais receptor Fc específico para imunoglobulina. As proteínas de ligação deste tipo incluem, por exemplo, aquelas que compreendem mudanças na seqüência de amino ácido nas posições que são proximais e/ou distais às regiões, domínios, e/ou estruturas de alça responsáveis pela glicosilação na proteína de ligação não modificada.

Exemplificadas aqui estão as proteínas de ligação que compreendem um ou mais domínios CH2 e/ou CH3 de articulação de cadeia pesada IgG, onde as proteínas de ligação compreendem uma ou mais modificações dentro de um ou mais domínios CH2 e/ou CH3 de articulação de cadeia pesada IgG onde a modificação compreende a inserção de uma ou mais seqüência(s) de glicosilação N-ligada e/ou uma ou mais seqüência(s) de glicosilação

35 O-ligada, cuja(s) seqüência(s) de glicosilação é suficiente para alcançar a glicosilação N- e/ou O-ligada na posição de inserção deste modo alterando (isto é, seja aumentando ou diminuindo) a afinidade e/ou especificidade de ligação da proteína de ligação a um ou mais

receptor(es) específico(s) para imunoglobulina IgG FcγRI (CD64); FcγRII (CD32), incluindo FcγRIIa, FcγRIIb, e FcγRIIc; e/ou FcγRIII (CD16), incluindo FcγRIIIa e FcγRIIIb, em comparação à proteína de ligação correspondente que compreende um ou mais domínios CH2 e/ou CH3 de articulação de cadeia pesada IgG não modificados.

5 Modalidades específicas dos referidos aspectos da presente invenção incluem as proteínas de ligação compreendendo um ou mais domínios de articulação de IgG, um ou mais domínios de CH2 IgG, e/ou um ou mais domínios de CH3 IgG onde o domínio CH2 e/ou CH3 de articulação, é um Domínio CH2 e/ou CH3 de articulação IgG1, um domínio CH2 e/ou CH3 de articulação IgG2, um domínio CH2 e/ou CH3 de articulação IgG3, e/ou um
10 domínio CH2 e/ou CH3 de articulação IgG4. Algumas das referidas modalidades proporcionam proteínas de ligação que compreendem a inserção de uma ou mais seqüência de glicosilação N-ligada N-X-(S/T) (onde X é qualquer amino ácido) e/ou uma ou mais seqüência de glicosilação O-ligada X-P-X-X (onde pelo menos um X é T), T-X-X-X (onde pelo menos um X é T), X-X-T-X (onde pelo menos um X é R ou K), e/ou S-X-X-X (onde pelo
15 menos um X é S)) proximal a e/ou distal ao campo de glicosilação N-ligada e/ou O-ligada no domínio CH2 e/ou CH3 de articulação de imunoglobulina IgG nativa correspondente. Dentro de determinados aspectos das referidas modalidades, a proteína de ligação exibe uma afinidade e/ou especificidade de ligação FcγR alterada (isto é, aumentada ou reduzida).

Exemplificadas aqui estão as referidas modalidades onde as proteínas de ligação
20 compreendem um ou mais domínios de articulação de IgG, um ou mais domínios de CH2 IgG, e/ou um ou mais domínios de CH3 IgG e onde as proteínas de ligação adicionalmente compreendem uma inserção de uma ou mais seqüência de glicosilação N-ligada N-X-(S/T) (onde X é qualquer amino ácido). Por exemplo, a presente invenção proporciona as referidas proteínas de ligação compreendendo uma inserção de uma ou mais seqüência N-
25 X-(S/T) adjacente à seqüência N-S-T nativa dentro da alça DE de um ou mais domínios CH2 IgG1, IgG2, IgG3, e/ou IgG4. Dentro de determinados aspectos das referidas modalidades, a proteína de ligação exibe uma afinidade e/ou especificidade de ligação a FcγR alterada (isto é, aumentada ou reduzida).

Dentro de determinadas modalidades específicas, a seqüência de glicosilação N-
30 ligada dentro da alça DE de um domínio CH2 IgG1, IgG2, IgG3, e/ou IgG4 compreende a seqüência de amino ácido N-S-T e é inserida adjacente a e/ou dentro de 0 a 10 amino ácidos amino-terminais e/ou carboxi-terminal à seqüência N-S-T nativa de modo que a seqüência de amino ácido X-N-S-T-Z é modificada a (AA^a)-N-S-T-(AA^b)-N-S-T-(AA^c) onde cada um de AA^a, AA^b, e AA^c independentemente designa de 1 a 100 amino ácidos. Dentro de
35 modalidades específicas, a seqüência de glicosilação N-ligada dentro da alça DE de domínio CH2 de IgG1, IgG2, IgG3, e/ou IgG4 compreende a seqüência de amino ácido N-S-T e é inserida adjacente à seqüência N-S-T nativa de modo que a seqüência de amino ácido

nativa X-N-S-T-Z é modificada em X-N-S-T-Z-N-S-T-Z, onde X e Z são independentemente selecionados a partir de Tyr (Y) e Phe (F).

Dentro de modalidades alternativas, a seqüência de glicosilação N-ligada inserida dentro da alça BC de um ou mais domínios CH3 IgG₁, IgG₂, IgG₃, e/ou IgG₄ compreende a seqüência de amino ácido N-S-T e é inserida distal à seqüência N-S-T nativa de modo que a seqüência de amino ácido nativa Y-P-S-D-I-A é modificada em Y-P-N-S-T-D-I-A e Y-N-S-T-P-S-D-I-A.

Dentro de ainda de aspectos adicionais, a presente invenção proporciona proteínas de ligação, em particular proteínas de ligação compreendendo um ou mais domínios CH2 e/ou CH3 de articulação de cadeia pesada de uma primeira classe de imunoglobulina (isto é, IgA, IgD, IgE, IgG, ou IgM), onde a proteína de ligação é modificada (isto é, por substituição de amino ácido e/ou inserção de amino ácido) na seqüência amino primária de um ou mais domínios CH2 e/ou CH3 de articulação de cadeia pesada da primeira classe de imunoglobulina para gerar uma proteína de ligação capaz de ligar a um ou mais receptores Fc cognatos de uma segunda classe de imunoglobulina distinta da primeira classe de imunoglobulina. As referidas mudanças incluem, por exemplo, a substituição e/ou a remodelagem de uma ou mais alças, ou amino ácido e/ou porções de peptídeos do mesmo, de um primeiro domínio de imunoglobulina com uma ou mais alças, ou o amino ácido e/ou as porções peptídeos do mesmo, de um segundo domínio de imunoglobulina, onde o segundo domínio de imunoglobulina compreende um ou mais amino ácidos que formam pelo menos uma porção de uma seqüência de ligação para o segundo receptor Fc imunoglobulina-específico. As proteínas de ligação de acordo com os referidos aspectos da presente invenção são capazes de especificamente se ligar a FcαR além de serem capazes de especificamente se ligar a FcγRI, FcγRII, e/ou FcγRIII.

Exemplificadas aqui estão as proteínas de ligação compreendendo um ou mais domínios CH2 e/ou CH3 de articulação de cadeia pesada IgG, onde a proteína de ligação é modificada para se ligar a um ou mais receptores Fc imunoglobulina-específico não IgG incluindo, mas não são limitados ao receptor imunoglobulina-específico IgA FcαR (CD89). As proteínas de ligação deste tipo incluem, por exemplo, as proteínas de ligação compreendendo mudanças (isto é, substituição de amino ácido e/ou inserção de amino ácido) na seqüência de amino ácido primária de um ou mais domínios CH2 e/ou CH3 de articulação de cadeia pesada IgG para gerar seqüências de amino ácido capazes de ligação a receptor Fc imunoglobulina-específico não-IgG tal como, por exemplo, a ligação a Fcα-receptor.

Em determinadas modalidades, são proporcionadas proteínas de ligação compreendendo um ou mais domínios CH2 e/ou CH3 de articulação de cadeia pesada IgG, onde a proteína de ligação é modificada para se ligar ao receptor imunoglobulina-específico

IgA FcαR (CD89). A referida proteína de ligação compreende uma ou mais substituições de amino ácido dentro da alça FG CH3 IgG e/ou uma ou mais substituições de amino ácido dentro da alça CD CH3 IgG. Por exemplo, uma das referidas proteínas de ligação exemplificativas compreende a substituição da alça FG CH3 IgG compreendendo a
 5 seqüência de amino ácido C-S-V-M-H-E-A-L-H-N-H-Y-T-Q, ou uma porção da mesma, com a alça FG CH3 IgA compreendendo a seqüência de amino ácido C-M-V-G-H-E-A-L-P-L-A-F-T-Q, ou uma porção correspondente do mesmo.

Outra proteína de ligação exemplificativa compreende a substituição da alça CD de CH3 IgG compreendendo a seqüência de amino ácido Q-P-E-N, ou uma porção da mesma,
 10 com a alça CD de CH3 IgA compreendendo a seqüência de amino ácido Q-E-L-P-R-E, ou uma porção da mesma. Ainda uma outra proteína de ligação exemplificativa compreende a substituição de ambas as alças FG CH3 IgG compreendendo a seqüência de amino ácido C-S-V-M-H-E-A-L-H-N-H-Y-T-Q, ou uma porção da mesma, com a alça FG CH3 de IgA compreendendo a seqüência de amino ácido C-M-V-G-H-E-A-L-P-L-A-F-T-Q, ou uma
 15 porção correspondente da mesma, e a alça CD CH3 IgG compreendendo a seqüência de amino ácido Q-P-E-N, ou uma porção da mesma, com a alça CD CH3 IgA compreendendo a seqüência de amino ácido Q-E-L-P-R-E, ou uma porção da mesma.

Qualquer uma das modalidades de proteínas de ligação acima mencionadas pode adicionalmente compreender a substituição do amino ácido CH3 de cadeia pesada IgG Met
 20 (na posição de amino ácido CH3 No. 28 dentro da seqüência K-D-T-L-M-I-S-R-T) com o amino ácido Leu de modo que uma proteína de ligação adicionalmente compreende a seqüência de amino ácido K-D-T-L-L-I-S-R-T. Alternativa ou adicionalmente, qualquer uma das modalidades de proteína de ligação pode adicionalmente compreender a substituição do amino ácido CH3 de cadeia pesada IgG Glu (na posição de amino ácido CH3 No. 157
 25 dentro da seqüência D-I-A-V-E-W-E-S-N) com o amino ácido Arg de modo que a proteína de ligação adicionalmente compreende a seqüência de amino ácido D-I-A-V-R-W-E-S-N.

Esses e outros aspectos da presente invenção se tornarão aparentes com referência à descrição detalhada a seguir e aos desenhos anexos. Todas as publicações, patentes e pedidos de patentes aqui mencionados, seja acima ou abaixo, se encontram aqui
 30 incorporados por referência em suas totalidades.

Breve descrição das figuras e identificadores de seqüência

A figura 1 apresenta o alinhamento de domínios CH2 IgG e IgA.

A figura 2 apresenta o alinhamento de uma região CH2-CH3 IgG do tipo selvagem e três modificações exemplificativas para a referida região adequada para a geração de
 35 proteínas de ligação de acordo com a presente invenção.

A figura 3 apresenta o alinhamento de regiões CH2 e CH2 a partir de IgA1, IgA2, IgM, IgG2, IgG2, IgG2, IgG2, e IgE e de alças de imunoglobulinas correspondentes.

(De Herr *et al.*, *Nature* 423:614 - 620 (2003))

SEQ ID NO: 1 é a sequência de amino ácido da região de articulação de IgA₁ humano (VPSTPPTPSPSTPPTSPS).

5 SEQ ID NO: 2 é a sequência de amino ácido da região CH2 de IgA₁ humano (CCHPRLSLHRPALEDLLLGSEANLTCTLTGLRDASGVFTWTPSSGKSAVQGPPERDLGC
CYSVSSVLPGCAEPWNHKGFTTCTAAYPESKTPLTATLSKS)

10 SEQ ID NO: 3 é a sequência de amino ácido da região CH3 de IgA₁ humano (GNTFRPEVHLLPPPSEELALNELVTLTCLARGFSPKDVLRWLQGSQELPREKYLTWASR
QEPSQGTTFFAVTSILRVAAEDWKKGDTFSCMVGHEALPLAFTQKTIDRLAGKPTHVNVSVV
MAEVDGTCY).

SEQ ID NO: 4 é a sequência de amino ácido da região de articulação de IgA₂ humano (VPPPPP).

15 SEQ ID NO: 5 é a sequência de amino ácido da região de IgA₂CH2 humano (CCHPRLSLHRPALEDLLLGSEANLTCTLTGLRDASGATFTWTPSSGKSAVQGPPERDLGC
CYSVSSVLPGCAQPWNHGETTCTAAHPELKTPLTANITKS).

SEQ ID NO: 6 é a sequência de amino ácido da região CH3 de IgA₂ humano (GNTFRPEVHLLPPPSEELALNELVTLTCLARGFSPKDVLRWLQGSQELPREKYLTWASR
QEPSQGTTFFAVTSILRVAAEDWKKGDTFSCMVGHEALPLAFTQKTIDRLAGKPTHVNVSVV
MAEVDGTCY).

20 SEQ ID NO: 7 é a sequência de amino ácido da região de articulação de IgD humano (ESPKAQASSVPTAQPAEGSLAKATTAPATTRNTGRGGEEKKKEKEKEEQEERETKTP).

25 SEQ ID NO: 8 é a sequência de amino ácido da região CH2 de IgD humano (ECPSHTQPLGVYLLTPAVQDLWLRDKATFTCFVVGSDLKDAHLTWEVAGKVPTGGVEEGL
LERHSNGSQSQHSRLTLPRSLWNAGTSVTCTLNHPSLPPQRLMALREP).

SEQ ID NO: 9 é a sequência de amino ácido da região CH3 de IgD humano (AAQAPVKLSLNLLASSDPPEAASWLLCEVSGFSPPNILLMWLEDQREVNTSGFAPARPPPQ
PRSTTFWAWSVLRVPAPPSPQPATYTCVSHEDSRTLNASRSLEVSIVTDHGPMK).

30 SEQ ID NO: 10 é a sequência de amino ácido da região CH2 de IgE humano (VCSRDFTPPTVKILQSSCDGGGHFPPTIQLLCLVSGYTPGTINITWLEDGQVMDVDLSTAST
TQEGELASTQSELTSQKHWLSDRTYTCQVTYQGHTFEDSTKKCA).

SEQ ID NO: 11 é a sequência de amino ácido da região CH3 de IgE humano (DSNPRGVSAYLSRPSPFDLFIKSPITITCLVVDLAPSKGTVNLTWSRASGKPVNHSTRKEE
KQRNGTLTVTSTLPVGTRDWIEGETYQCRVTHPHLPRALMRSTTKTS).

35 SEQ ID NO: 12 é a sequência de amino ácido da região CH4 de IgE humano (GPRAAPEVYAFATPEWPGSRDKRTLACLIQNFMPEDISVQWLHNEVQLPDARHSTTQPRK
TKGSGFFVFSRLEVTRAWEQKDEFICRAVHEAASPSQTVQRAVSVNPGK).

SEQ ID NO: 13 é a sequência de amino ácido da região de articulação de IgG₁ humano (EPKSCDKTHTCPPCP).

SEQ ID NO: 14 é a sequência de amino ácido da região CH2 de IgG₁ humano (APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKP
5 REEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK).

SEQ ID NO: 15 é a sequência de amino ácido da região CH3 de IgG₁ humano (GQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDS
DGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK).

SEQ ID NO: 16 é a sequência de amino ácido da região de articulação IgG₂
10 humano (ERKCCVECPPCP).

SEQ ID NO: 17 é a sequência de amino ácido da região CH2 de IgG₂ humano (APPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKP
REEQFNSTFRVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTISKTK).

SEQ ID NO: 18 é a sequência de amino ácido da região CH3 de IgG₂ humano
15 (GQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPMLDS
DGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK).

SEQ ID NO: 19 é a sequência de amino ácido da região de articulação de IgG₃ humano
(ELKTPLGDTTHTCPRCPEPKSCDTPPPCPRCPEPKSCDTPPPCPRCPEPKSCDTPPPCPR
20 CP).

SEQ ID NO: 20 é a sequência de amino ácido da região CH2 de IgG₃ humano (APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVQFKWYVDGVEVHNAKTKP
REEQYNSTFRVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKTK).

SEQ ID NO: 21 é a sequência de amino ácido da região CH3 de IgG₃ humano
25 (GQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESSGQPENNYNTTPMLDS
DGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNIFCFSVMHEALHNRFTHNQKSLSLSPGK).

SEQ ID NO: 22 é a sequência de amino ácido da região de articulação de IgG₄ humano (ESKYGPPCPSCP).

SEQ ID NO: 23 é a sequência de amino ácido da região CH2 de IgG₄ humano
30 (APEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSDQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTK
PREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAK).

SEQ ID NO: 24 é a sequência de amino ácido da região CH3 de IgG₄ humano (GQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDS
DGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK).

SEQ ID NO: 25 é a sequência de amino ácido da região CH2 de IgM humano
35 (VIAELPPKVSFVPPRDGFFGNPRKSKLICQATGFSPRQIQVSWLREGKQVGSVTTDQVQ
AEAKESGPTTYKVTSTLTIKESDWLGQSMFTCRVDHRGLTFQQNASSMCVP).

SEQ ID NO: 26 é a sequência de amino ácido da região CH3 de IgM humano (DQDTAIRVFAIPPSFASIFLTSTKLTCLVTDLTITYDSVTISWTRQNGEAVKTHTNISESHRNA TFSAVGEASICEDDWNSGERFTCTVTHDLPSPKQTISRPK).

5 SEQ ID NO: 27 é a sequência de amino ácido da região CH4 de IgM humano (GVALHRPDVYLLPPAREQLNLRESATITCLVTGFSPADVQVQWMQRGQPLSPEKYVTSAP MPEPQAPGRYFAHSILTVSEEEWNTGETYTCVVAHEALPNRVTERTVDKSTGKPTLYNVSL VMSDTAGTCY).

SEQ ID NO: 28 é a sequência de nucleotídeos da região de primer de oligonucleotídeo designada aqui como Bci-I Forward (ttc ttc tga tca gga gcc caa at).

10 SEQ ID NO: 29 é a sequência de nucleotídeos da região de primer de oligonucleotídeo designada aqui como Sac-II Reverso (GCT CCT CCC GCG GCT TTG TCT TGG).

15 SEQ ID NO: 30 é a sequência de nucleotídeos da região de primer de oligonucleotídeo designada aqui como Lib1A_F1 (ttc ttc tga tca gga gcc caa atc ttc tga caa aac tca cac atc tcc acc gtg ccc ag).

SEQ ID NO: 31 é a sequência de nucleotídeos da região de primer de oligonucleotídeo designada aqui como Lib1A_F2 (ggg acc gtc agt ctt cct ctt ccc ccc aaa acc caa gga cac cct cat gat ctc ccg ga).

20 SEQ ID NO: 32 é a sequência de nucleotídeos da região de primer de oligonucleotídeo designada aqui como Lib1A_F3 (tgt ggt gga cgt gag cca cga aga ccc tga ggt caa gtt caa ctg gta cgt gga cgg cg).

SEQ ID NO: 33 é a sequência de nucleotídeos da região de primer de oligonucleotídeo designada aqui como Lib1A_R1 (AGA GGA AGA CTG ACG GTC CAC CNW NCA AGA GTT CAG GTG CTG GGC ACG GTG GAG ATG TGT).

25 SEQ ID NO: 34 é a sequência de nucleotídeos da região de primer de oligonucleotídeo designada aqui como Lib1A_R2 (CGT GGC TCA CGT CCA CCA CCA CGC ATG TGA CCT CAG GGG TCC GGG AGA TCA TGA GGG TGT).

30 SEQ ID NO: 35 é a sequência de nucleotídeos da região de primer de oligonucleotídeo designada aqui como Lib1A_R3 (GCT CCT CCC GCG GCT TTG TCT TGG CAT TAT GCA CCT CCA CGC CGT CCA CGT ACC AGT TGA).

SEQ ID NO: 36 é a sequência de nucleotídeos da região de primer de oligonucleotídeo designada aqui como Lib1B_F2 (wgg acc gtc agt ctt cct ctt ccc ccc aaa acc caa gga cac cct cat gat ctc ccg ga).

35 SEQ ID NO: 37 é a sequência de nucleotídeos da região de primer de oligonucleotídeo designada aqui como Lib1B_R1 (AGA GGA AGA CTG ACG GTC CNW NAC CCA AGA GTT CAG GTG CTG GGC ACG GTG GAG ATG TGT).

SEQ ID NO: 38 é a sequência de nucleotídeos da região de primer de

oligonucleotídeo designada aqui como Lib1C_F2 (gnw ncc gtc agt ctt cct ctt ccc ccc aaa acc caa gga cac cct cat gat ctc ccg ga).

SEQ ID NO: 39 é a sequência de nucleotídeos da região de primer de oligonucleotídeo designada aqui como Lib1C_R1 (AGA GGA AGA CTG ACG GNW NTC
5 CAC CCA AGA GTT CAG GTG CTG GGC ACG GTG GAG ATG TGT).

SEQ ID NO: 40 é a sequência de nucleotídeos da região de primer de oligonucleotídeo designada aqui como Lib2A_F2 (gcc gtc agt ctt cct ctt ccc ccc aaa acc caa gga cac cct cat gat ctc ccg gac cc).

SEQ ID NO: 41 é a sequência de nucleotídeos da região de primer de
10 oligonucleotídeo designada aqui como Lib2A_F3 (tgt gga cgt gnw nag cca cga aga ccc tga ggt caa gtt caa ctg gta cgt gga cgg cg).

SEQ ID NO: 42 é a sequência de nucleotídeos da região de primer de oligonucleotídeo designada aqui como Lib2A_R1 (GGA AGA GGA AGA CTG ACG GTC CAC CCA AGA GTT CAG GTG CTG GGC ACG GTG GAG ATG TGT).

15 SEQ ID NO: 43 é a sequência de nucleotídeos da região de primer de oligonucleotídeo designada aqui como Lib2A_R2 (CGT GGC TNW NCA CGT CCA CCA CCA CGC ATG TGA CCT CAG GGG TCC GGG AGA TCA TGA GG).

SEQ ID NO: 44 é a sequência de nucleotídeos da região de primer de oligonucleotídeo designada aqui como Lib2B_F3 (tgt gga cgt gag cnw nca cga aga ccc tga
20 ggt caa gtt caa ctg gta cgt gga cgg cg).

SEQ ID NO: 45 é a sequência de nucleotídeos da região de primer de oligonucleotídeo designada aqui como Lib2B_R2 (CGT GNW NGC TCA CGT CCA CCA CCA CGC ATG TGA CCT CAG GGG TCC GGG AGA TCA TGA GGG).

25 SEQ ID NO: 46 é a sequência de nucleotídeos da região de primer de oligonucleotídeo designada aqui como lib3A-F (gtc tcc aac aaa gcc nwn ctc cca gcc ccc atc).

SEQ ID NO: 47 é a sequência de nucleotídeos da região de primer de oligonucleotídeo designada aqui como lib3A-R (GAT GGG GGC TGG GAG NWN GGC TTT GTT GGA GAC).

30 SEQ ID NO: 48 é a sequência de nucleotídeos da região de primer de oligonucleotídeo designada aqui como Lib3B-F (ccc aac aaa gcc ctc nwn cca gcc ccc atc gag).

SEQ ID NO: 49 é a sequência de nucleotídeos da região de primer de oligonucleotídeo designada aqui como Lib3B-R (CTC GAT GGG GGC TGG NWN GAG GGC TTT GTT GGA G).

35 SEQ ID NO: 50 é a sequência de nucleotídeos da região de primer de oligonucleotídeo designada aqui como Lib3C-F (cac aaa gcc ctc cca nwn gcc ccc atc gag aaa ac).

SEQ ID NO: 51 é a sequência de nucleotídeos da região de primer de oligonucleotídeo designada aqui como Lib3C-R (GTT TTC TCG ATG GGG GCN WNT GGG AGG GCT TTG TTG).

5 SEQ ID NO: 52 é a sequência de nucleotídeos da região de primer de oligonucleotídeo designada aqui como F1_ver1 (cag aac cac agg tgt aca ccc tgc ccc cat ccc ggg atg agc tga cca aga acc agg).

SEQ ID NO: 53 é a sequência de nucleotídeos da região de primer de oligonucleotídeo designada aqui como F2_ver1 (agc ttc tat cca agc gac atc gcc gtg cgt tgg gag agc aat ggg cag gag ctg ccg).

10 SEQ ID NO: 54 é a sequência de nucleotídeos da região de primer de oligonucleotídeo designada aqui como F3_ver1 (ccc cgt gct gga ctc cga cgg ctc ctt ctt cct cta cag caa gct cac cgt gga caa).

15 SEQ ID NO: 55 é a sequência de nucleotídeos da região de primer de oligonucleotídeo designada aqui como F4_ver1 (gct tct cct gca tgg tga tgc atg agg ctc tgc cac tcg cct tca cgc aga aga gcc).

SEQ ID NO: 56 é a sequência de nucleotídeos da região de primer de oligonucleotídeo designada aqui como R1_ver1 (tgc ttg gat aga agc ctt tga cca ggc agg tca ggc tga cct ggt tct tgg tca gct).

20 SEQ ID NO: 57 é a sequência de nucleotídeos da região de primer de oligonucleotídeo designada aqui como R2_ver1 (cga gtc cag cac ggg agg cgt ggt ctt gta gtt gtt ctc cgg cag ctc ctg ccc att).

SEQ ID NO: 58 é a sequência de nucleotídeos da região de primer de oligonucleotídeo designada aqui como R3_ver1 (ccc atg cag gag aag acg ttc ccc tgc tgc cac ctg ctc ttg tcc acg gtg agc ttg).

25 SEQ ID NO: 59 é a sequência de nucleotídeos da região de primer de oligonucleotídeo designada aqui como R4_ver1 (cgc tat aat cta gat cat tta ccc gga gac agg gag agg ctc ttc tgc gtg aag g).

SEQ ID NO: 60 é a sequência de nucleotídeos da região de primer de oligonucleotídeo designada aqui como short-F (cag aac cac agg tgt aca ccc tgc cc).

30 SEQ ID NO: 61 é a sequência de nucleotídeos da região de primer de oligonucleotídeo designada aqui como short-R (cct ata atc tag atc att tac c).

SEQ ID NO: 62 é a sequência de nucleotídeos da região de primer de oligonucleotídeo designada aqui como F4_ver2 (gtc ttc tcc tgc atg gtg ggc cac gag gcc ctg ccg ctg gcc ttc aca cag aag acc a).

35 SEQ ID NO: 63 é a sequência de nucleotídeos da região de primer de oligonucleotídeo designada aqui como R4_ver2 (cgc tat aat cta gat cat tta ccc gcc aag cgg tcg atg gtc ttc tgt gtg aag g).

SEQ ID NO: 64 é a sequência de nucleotídeos da região de primer de oligonucleotídeo designada aqui como F2_ver3 (agg ctt cta tcc aag cga cat cgc cgt tcg ctg gct gca ggg gtc aca gga gct gcc c).

5 SEQ ID NO: 65 é a sequência de nucleotídeos da região de primer de oligonucleotídeo designada aqui como R2_ver3 (cga gtc cag cac ggg agg cgt ggt ctt gta ctt ctc gcg ggg cag ctc ctg tga ccc).

Descrição Detalhada da Invenção

Como indicado acima, a presente invenção proporciona proteínas de ligação compreendendo um ou mais domínio(s) CH2 e/ou CH3, de articulação de região constante de imunoglobulina onde um ou mais domínios CH2 e/ou CH3 de região constante e/ou articulação é modificado para alterar uma ou mais função(ões) efetoras Fc da proteína de ligação. Exemplificadas aqui estão as proteínas de ligação onde a região Fc de articulação de imunoglobulina é modificada para alcançar uma afinidade e/ou especificidade de ligação alterada para um receptor cognato (por exemplo, um receptor Fc) e/ou para proporcionar 15 uma ou mais nova(s) especificidade(s) de ligação à região Fc que a proteína de ligação não modificada correspondente não possui (por exemplo, afinidade para um ou mais receptores Fc que é distinta do receptor cognato ao qual a proteína de ligação não modificada especificamente se liga).

Especificamente, as proteínas de ligação modificadas aqui descritas incluem o a 20 seguir:

(1) proteínas de ligação compreendendo uma inserção de um ou mais amino ácidos dentro de uma região CH2 e/ou CH3 de articulação de imunoglobulina onde a imunoglobulina exibe uma afinidade e/ou especificidade de ligação alterada (isto é, aumentada ou reduzida) para um ou mais de FcγRI (CD64); FcγRII (CD32), incluindo 25 FcγRIIa, FcγRIIb, e FcγRIIc; e/ou FcγRIII (CD16), incluindo FcγRIIIa e FcγRIIIb;

(2) proteínas de ligação compreendendo uma inserção de uma ou mais sequência(s) de glicosilação N-ligada e/ou O-ligada (tais como, por exemplo, uma ou mais sequência(s) de glicosilação N-X-(S/T) N-ligadas e/ou uma ou mais X-P-X-X (onde pelo menos um X é T), T-X-X-X (onde pelo menos um X is T), X-X-T-X (onde pelo menos um X is 30 R ou K), e S-X-X-X (onde pelo menos um X is S)) proximal a e/ou distal ao campo de ligação glicosilação N-ligada e/ou O-ligada na região Fc de imunoglobulina nativa correspondente, onde a proteína de ligação exibe uma afinidade e/ou especificidade de ligação a FcγR alterada (isto é, aumentada ou reduzida); e

(3) proteínas de ligação compreendendo a inserção e/ou a substituição de um ou 35 mais amino ácidos dentro de uma região CH2 e/ou CH3 de imunoglobulina IgG onde a inserção e/ou a substituição de amino ácido compreende um ou mais amino ácidos correspondendo a uma região CH2 e/ou CH3 de imunoglobulina IgA, onde o(s) um ou mais

amino ácido(s) de uma região CH2 e/ou CH3 de imunoglobulina IgA participa na ligação específica de uma imunoglobulina IgA com o seu receptor Fc cognato e onde a proteína de ligação modificada é capaz de se ligar especificamente ao Fc α R.

5 Cada uma das referidas modalidades da presente invenção é descrita em maiores detalhes abaixo.

A prática da presente invenção irá empregar, a não ser que indicado especificamente o contrário, métodos convencionais de imunologia, biologia molecular, e química de proteína dentro da técnica, muitas das quais são descritas abaixo com o objetivo apenas de ilustração. As referidas técnicas são explicadas amplamente na literatura. Ver, 10 por exemplo, Sambrook, *et al.*, "Molecular Cloning: A Laboratory Manual" (segunda edição, 1989); "DNA Cloning: A Practical Approach, vol. I & II" (D. Glover, *ed.*); "Oligonucleotide Synthesis" (N. Gait, *ed.*, 1984); "Nucleic Acid Hybridization" (B. Hames & S. Higgins, *eds.*, 1985); Perbal, "A Practical Guide to Molecular Cloning" (1984); Ausubel *et al.*, "Current Protocols in Molecular Biology" (New York, John Wiley e Sons, 1987); Bonifacino *et al.*, 15 "Current Protocols in Cell Biology" (New York, John Wiley & Sons, 1999); Coligan *et al.*, "Current Protocols in Immunology" (New York, John Wiley & Sons, 1999); Harlow e Lane *Antibodies: a Laboratory Manual* Cold Spring Harbor Laboratory (1988); e Lo, Ed., "Antibody Engineering: Methods and Protocols," Part 1 (Humana Press, Totowa, New Jersey, 2004). As técnicas para a produção de ambos os tipos de mutação são bem conhecidas na técnica. 20 Por exemplo, as mutações específicas podem ser introduzidas usando mutagêneses específica de campo como descrito em Sambrook *et al.*, "Protocols in Molecular Biology," *supra*. Mutações aleatórias em regiões específicas podem ser introduzidas usando, por exemplo, evolução forçada como descrito em Gulick e Fahl, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 92:8140-8144 (1995).

25 DEFINIÇÕES

Como usado aqui, o termo "proteína de ligação" se refere a proteínas compreendendo um ou mais domínios CH2 e/ou CH3 de articulação de cadeia pesada de imunoglobulina. "proteína de ligação" inclui e é mais preferivelmente uma imunoglobulina tal como um anticorpo ou equivalente biológico ou funcional do mesmo e inclui partes, 30 fragmentos, formas precursoras, derivados, variantes, e formas trabalhadas por engenharia genética das mesmas e incluem a marcação com produtos químicos e/ou radioisótopos e semelhante. "proteínas de ligação" incluem, mas não são limitados a, "imunoglobulinas", "anticorpos", "anticorpos monoclonais", "anticorpos quiméricos", "anticorpos humanizados", e "produtos imunofarmacêuticos modulares pequenos" (isto é, produtos CMIP™) onde uma ou 35 seqüências de amino ácido em um domínio CH2 e/ou CH3 de articulação de imunoglobulina é alterado. Em determinadas modalidades, as proteínas de ligação modificadas aqui descritas compreendem mudanças em uma ou mais seqüência de amino ácido no domínio

CH2 e/ou CH3 da articulação que são responsáveis pela afinidade e/ou especificidade de ligação do receptor.

Os termos “imunoglobulina” e “anticorpo” amplamente incluem todas as classes e subclasses de anticorpos incluindo IgM, IgD, IgG₁, IgG₂, IgG₃, IgG₄, IgE, IgA₁ e IgA₂. O termo “anticorpo” inclui “anticorpo monoclonal” o qual como usado aqui, se refere a um anticorpo obtido a partir da população de anticorpos substancialmente homogêneos, isto é, os anticorpos individuais compreendendo a população são idênticos exceto pelas mutações de ocorrência natural que não afetam substancialmente a especificidade, afinidade e/ou atividade de ligação do anticorpo. “Anticorpos monoclonais” incluem, mas não são limitados a, anticorpos monoclonais não humanos, monoclonais quiméricos, monoclonais humanizados, e monoclonais completamente humanos assim como os fragmentos e/ou porções de ligação a antígeno dos mesmos.

Como usado aqui, o termo “anticorpos quiméricos” se refere a moléculas de anticorpos monoclonais que compreendem cadeias pesadas e leves nos quais os domínios variáveis de anticorpo não humano são operacionalmente fundidos aos domínios constantes humanos. Os anticorpos quiméricos em geral exibem imunogenicidade reduzida em comparação ao anticorpo monoclonal completamente humano parental.

Como usado aqui, o termo “anticorpos humanizados” se refere a anticorpos monoclonais compreendendo um ou mais regiões de determinação de complementaridade não humana (CDR), uma região de estrutura de domínio variável (FR), e um domínio constante de cadeia pesada humana, tal como o domínio constante de cadeia pesada IgG₁, IgG₂, IgG₃, e IgG₄ e o domínio constante de cadeia leve humana tal como o domínio constante de cadeia leve IgLambda e IgKappa. Como usado aqui, o termo “anticorpo humanizado” significa incluir anticorpos monoclonais humanos (anticorpo receptor) no qual os resíduos a partir de uma região de determinação de complementaridade (CDR) do receptor são substituídos por resíduos de uma CDR de espécies não humanas (anticorpo doador) tal como rato, camundongo, ou coelho dotado da especificidade, afinidade e capacidade desejadas. Em alguns casos, os resíduos de estrutura de domínio variável do anticorpo humano são substituídos pelos resíduos não humanos correspondentes. Os anticorpos humanizados podem ainda compreender resíduos que são encontrados nem no anticorpo receptor nem na CDR importada ou seqüências de estrutura. Métodos para a humanização de anticorpos não humanos apresentam um ou mais resíduos de amino ácidos introduzidos no mesmo a partir de uma fonte que não é humana. A humanização pode ser alcançada ao se enxertar CDRs em um FR de suporte humano antes da fusão com um domínio constante de anticorpo humano apropriado. Ver, Jones *et al.*, *Nature* 321:522-525 (1986); Riechmann *et al.*, *Nature* 332:323-327 (1988); e Verhoeven *et al.*, *Science* 239:1534-1536 (1988).

Como usado aqui, o termo “anticorpo completamente humano” se refere à imunoglobulinas compreendendo regiões variáveis humanas além da estrutura humana e das regiões constantes. Os referidos anticorpos podem ser produzidos usando diversas técnicas conhecidas na técnica. Por exemplo, a metodologia de exibição de fago foi descrita onde bibliotecas recombinantes de fragmentos de anticorpos humanos são exibidas em um bacteriófago. Ver, McCafferty *et al.*, *Nature* 348:552-554 (1990); Hoogenboom e Winter, *J. Mol. Biol.* 227:381 (1991); e Marks *et al.*, *J. Mol. Biol.* 222:581 (1991).

Alternativamente, “anticorpos completamente humanos” podem ser produzidos em animais transgênicos compreendendo o repertório de imunoglobulina humana e maquinário para efetuar a reorganização de gene e o conjunto de imunoglobulina. O uso de tecnologia de hibridoma, anticorpos completamente humanos específicos a antígeno com a especificidade desejada podem ser produzidos e selecionados. Um sistema de animal transgênico exemplificativo é a cepa XenoMouse® descrita por Green *et al.*, *Nature Genetics* 7:13-21 (1994). As cepas XenoMouse® são trabalhadas por engenharia genética com cromossomos artificiais de levedura (YACs) contendo fragmentos de configuração de linha germinal 245 kb e 190 kb, respectivamente, do locus de cadeia pesada humana e do locus de cadeia leve kappa que contém seqüências de região constante e núcleo variável. Ig humano contendo YACs são compatíveis com o sistema de rato tanto para a reorganização como para a expressão de anticorpos e são capazes de substituir os genes Ig de rato inativados. Mais recentemente, Mendez *et al.*, descreveu a introdução de aproximadamente 80% do repertório de anticorpo humano como fragmentos YAC de linha germinal configurada megabase dos loci de cadeia pesada humana e dos loci de cadeia leve kappa. *Nature Genetics* 15:146-156 (1997). Os sistemas de animais transgênicos adequados para gerar anticorpos completamente humanos de acordo com a presente invenção foram também descritos nas patentes U.S. Nos. 6,150,584; 5,545,807; 5,545,806; 5,569,825; 5,625,126; 5,633,425; 5,661,016 assim como em Jakobavits, *Adv Drug Deliv Rev.* 31:33-42 (1998); Marks *et al.*, *Bio/Technology* 10:779-783 (1992); Lonberg *et al.*, *Nature* 368:856-859 (1994); Morrison, *Nature* 368:812-13 (1994); Fishwild *et al.*, *Nature Biotechnology* 14:845-51 (1996); Neuberger, *Nature Biotechnology* 14:826 (1996); e Lonberg e Huszar, *Intern. Rev. Immunol.* 13:65-93 (1995).

Em uma modalidade alternativa para gerar anticorpos completamente humanos, outros empregaram “miniloci” onde um locus Ig exógeno é mimetizado através da inclusão de fragmentos de genes individuais a partir do locus Ig. Assim, ou um mais genes V_H, um ou mais genes D_H, um ou mais genes J_H, uma região constante um, e uma segunda região constante (tipicamente uma região gama constante) são formadas em um construtor para inserção em um animal. A referida abordagem foi descrita na patente U.S. No. 5,545,807 to Surani *et al.* (Medical Research Council) e U.S. Patent Nos. 5,545,806 e 5,625,825 to

Lonberg e Kay (GenPharm International, Inc.) assim como em Taylor *et al.*, *International Immunology* 6:579-591 (1994); Chen *et al.*, *International Immunology* 5:647-656 (1993), Tuailon *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:3720-3724 (1993); Tuailon *et al.*, *J. Immunol.* 154:6453-6465 (1995); Choi *et al.* *Nature Genetics* 4:117-123 (1993); Lonberg *et al.*, *Nature* 368:856- 859 (1994); e Taylor *et al.*, *Nucleic Acids Res.* 20:6287-6295 (1992).

Os anticorpos humanos evitam determinados problemas associados com os anticorpos que possuem regiões variáveis e/ou constantes de rato ou camundongo. A presença das referidas seqüências derivadas de camundongo ou rato podem conduzir a uma rápida depuração dos anticorpos ou pode conduzir à geração de uma resposta imune contra o anticorpo pelo paciente. Assim, o uso de anticorpos completamente humanos pode proporcionar uma vantagem substancial no tratamento de doenças humanas crônicas ou recorrentes, tais como inflamação, auto-imunidade, e câncer, que necessitam de administração de anticorpos repetidas.

Como usado aqui, o termo “produtos imunofarmacêuticos modulares pequenos” (produtos SMIP™) se refere a uma classe de compostos altamente modulares dotados de propriedades de droga aprimoradas em relação aos anticorpos monoclonais e recombinantes. Os produtos SMIP compreendem uma cadeia de polipeptídeo simples incluindo um domínio de ligação alvo-específico, com base, por exemplo, no domínio variável de anticorpo, em combinação com uma região FC variável que permite o recrutamento específico de uma classe desejada de células efectoras (tais como, por exemplo, macrófagos, células exterminadoras naturais (NK) e/ou recrutamento de morte mediado a complemento. Dependendo da escolha do alvo e das regiões de articulação, os produtos SMIP podem sinalizar ou bloquear a sinalização por meio de receptores de superfície celular. Como usado aqui, as proteínas de fusão trabalhadas por engenharia, denominadas de “produtos imunofarmacêuticos modulares pequenos” ou produtos SMIP™, são como descritas nas publicações de patentes U.S. co-cessionadas de Nos. 2003/133939, 2003/0118592, e 2005/0136049, e publicações de patente internacional co-cessionadas WO02/056910, WO2005/037989, e WO2005/017148,

As proteínas de ligação de acordo com a presente invenção são modificadas para alterar a(s) sua(s) função(ões) efetora(s) de modo que as mesmas se ligam com maior ou menor afinidade e/ou especificidade (a) a um ou mais receptores Fc cognatos e/ou (b) a um ou mais receptores Fc não cognatos. Uma proteína de ligação é capaz de “ligação específica” a um receptor cognato ou não cognato se a mesma reage a um nível detectável (dentro, por exemplo, de um teste ELISA) com o receptor cognato alvo mas não reage de modo detectável com o polipeptídeo não relacionado sob condições similares. “Ligação específica”, como usado aqui, em geral se refere a interações não covalentes do tipo que ocorrem entre uma região FC de anticorpo e um receptor para o qual a região Fc de

anticorpo é específica.

A resistência ou a afinidade das interações de “ligações específicas” pode ser expressa em termos de constante de dissociação (K_d) da interação, onde uma K_d menor representa uma maior afinidade. As propriedades de ligação podem ser quantificadas usando os métodos bem conhecidos na técnica. Um dos referidos métodos se refere à medição dos coeficientes de formação de complexo de proteína de ligação específica a alvo/receptor Fc (isto é, associação) e dissociação, onde os referidos coeficientes dependem das concentrações dos parceiros de complexo, da afinidade da interação, e nos parâmetros geométricos que igualmente influenciam o coeficiente em ambas as direções. Assim, tanto a “constante em coeficiente (K_{on})” como a “constante fora do coeficiente (K_{off})” podem ser determinadas ao se calcular as concentrações e os coeficientes atuais de associação e dissociação. A proporção de K_{off}/K_{on} permite o cancelamento de todos os parâmetros não relacionados à afinidade, e é assim igual à constante de dissociação K_d . Ver, em geral, Davies *et al.*, *Annual Rev. Biochem.* **59**:439-473 (1990). Por “ligação específica” aqui se quer dizer que as proteínas de ligação se ligam aos receptores Fc alvo, proteínas e/ou a outras moléculas com uma constante de dissociação que está na faixa de pelo menos 10^{-6} - 10^{-9} M, mais comumente pelo menos 10^{-7} - 10^{-9} M.

Como usado na presente especificação e nas reivindicações anexas, as formas singulares “o”, “a” incluem as referencias plurais a não ser que o contexto dite claramente o contrário.

Estrutura de Região Constante de Imunoglobulina

As proteínas de ligação da presente invenção compreendem, em combinação operável, um ou mais domínio(s) CH2 e/ou CH3 de articulação a partir de uma ou mais imunoglobulinas selecionada a partir do grupo que consiste em IgM, IgD, IgG₁, IgG₂, IgG₃, IgG₄, IgE, IgA₁ e IgA₂. Proteínas de ligação exemplificativas compreendem um ou mais domínio(s) CH2 e/ou CH3 de articulação de uma imunoglobulina IgG selecionada a partir de IgG₁, IgG₂, IgG₃, e IgG₄. Como descrito em detalhes aqui, as proteínas de ligação da presente invenção são alteradas em uma seqüência de amino ácido pela inserção, deleção e/ou substituição de um ou mais amino ácidos de um domínio(s) CH2 e/ou CH3 de articulação de uma imunoglobulina de ocorrência natural.

A seqüência de amino ácido dos domínio(s) CH2 e/ou CH3 de articulação de imunoglobulina são apresentadas na tabela 1 a seguir que é adaptada a partir das seqüências proporcionadas pelo International ImMunoGeneTics Information System (IMGT) cujas seqüências se encontram publicamente disponíveis, por exemplo, em <http://imgt.cines.fr/> e descritas aqui como SEQ ID NOs 1 - 27.

Tabela 1

Seqüência de amino ácido primário de uma articulação de região Fc de imunoglobulina e domínios CH

Classe de imunoglobulina	Domínio de cadeia pesada	SEQ ID NO	Seqüência de amino ácido
IgA ₁	articulação	1	(V)PSTPPTPSPSTPPTSPSPS
	CH2	2	CCHPRLSLHRPALEDLLLGSEAN <u>LT</u> CTLTGLRDASGVTF T WTPSSGKSAVQGPPERDLCGCYSVSSVLPGCAEPWNH GKT FTCTAAYPESKTPLTATLSKS
	CH3	3	(G)NTFRPEVHLLPPPSEELALNELVTLTCLARGFSPKDV LVRWLQGSQELPREKYLTWASRQEPSQGTTTTFAVTSIL RV AAEDWKKGDTFSCMVGHEALPLAFTQKTIDRLAGKPTH <u>VN</u> <u>VS</u> VVMAEVDGTCY
IgA ₂	articulação	4	(V)PPPPP
	CH2	5	CCHPRLSLHRPALEDLLLGSEAN <u>LT</u> CTLTGLRDASGATF T WTPSSGKSAVQGPPERDLCGCYSVSSVLPGCAQPWNH GET FTCTAAHPELKTPLTAN <u>IT</u> KS
	CH3	6	(G)NTFRPEVHLLPPPSEELALNELVTLTCLARGFSPKDV LVRWLQGSQELPREKYLTWASRQEPSQGTTTTFAVTSIL RV AAEDWKKGDTFSCMVGHEALPLAFTQKTIDRLAGKPTH <u>VN</u> <u>VS</u> VVMAEVDGTCY
IgD	articulação	7	(E)SPKAQASSVPTAQPAEGSLAKATTAPATTRNT(G)R GGEEKKKEKEKEEQEERETKTP
	CH2	8	(E)CPSHTQPLGVYLLTPAVQDLWLRDKATFTCFVVGSD L KDAHLTWEVAGKVPTGGVEEGLLERHS <u>NGS</u> QSQSRL

			TLP RSLWNAAGTSVTCTLNHPSLPPQRLMALREP
	CH3	9	(A)AQAPVKLSLNLLASSDPPEAASWLLCEVSGFSPPNIL LMWLEDQREV <u>NT</u> SGFAPARPPPQPRSTTFWAWSVLRV PAP PSPQPATYTCVVSHEDSRTL <u>LN</u> ASRSLEVS(Y)VTDHGP M K
IgE	CH2	10	(V)CSRDFTPPTVKILQSSCDGGGHFPPTIQLLCLVSGYT PGT <u>INIT</u> WLEDGQVMDVDLSTASTTQEGELASTQSELT S QKHWLSDRTYTCQVTYQGHTFEDSTKKCA
	CH3	11	(D)SNPRGV SAYLSRSPFDLFIRKSPTITCLVVDLAPSK GTV <u>NLT</u> WSRASGKPV <u>NH</u> STRKEEKQR <u>NGT</u> LTVTSTLPV GT RDWIEGETYQCRVTHPHLPRALMRSTTKTS
	CH4	12	(G)PRAAPEVYAFATPEWPGSRDKRTLACLIQNFMPEDIS VQWLHNEVQLPDARHSTTQPRKTKGSGFFVFSRLEVTR AE WEQKDEFICRAVHEAASPSQTVQRAVSVNPGK
IgG ₁	articulação	13	(E)PKSCDKTHTCPPCP
	CH2	14	(A)PELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSH EDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQY <u>NST</u> YRVVSVL TV LHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK
	CH3	15	(G)QPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIA VEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGGSFFLYSKLTVDKSR WQ QGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
IgG ₂	articulação	16	(E)RKCCVECPPCP
	CH2	17	(A)PPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHE DPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQF <u>NST</u> FRVVSFLT VV HQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTISKTK
	CH3	18	(G)QPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIA VEWESNGQPENNYKTTTPMLDSGGSFFLYSKLTVDKSR WQ

			QGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
IgG ₃	articulação	19	(E)LKTPLGDTTHTCPRCP(E)PKSCDTPPPCPRCP(E)P KSCDTPPPCPRCP(E)PKSCDTPPPCPRCP
	CH2	20	(A)PELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVWVDVSH EDPEVQFKWYVDGVEVHNAKTKPREEQY <u>NST</u> FRVSVL TV LHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKTK
	CH3	21	(G)QPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIA VEWESSGQPENNY <u>NTT</u> PPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSR WQ QGNIFSCSVMHEALHNRFTQKSLSLSPGK
IgG ₄	articulação	22	(E)SKYGPPCPSCP
	CH2	23	(A)PEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVWVDVSQ EDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQF <u>NST</u> YRVSVL TV LHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAK
	CH3	24	(G)QPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDI A VEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGSGFFLYSRLTVDKSR WQ EGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLGK
IgM	CH2	25	(V)IAELPPKVSFVPPRDGFFGNPRKSKLICQATGFSPR QIQVSWLREGKQVGSVTTDQVQAEAKESGPTTYKVTS TL TIKESDWLGQSMFTCRVDHRGLTFQQ <u>NASS</u> MCVP
	CH3	26	(D)QDPAIRVFAIPPSFASIFLTSTKLTCLVTDLTITYDS VTISWTRQNGEAVKTHTN <u>ISE</u> SHPN <u>AT</u> FSAVGEASICED D WNSGERFTCTVTHDLPSPKQTISRPK
	CH4	27	(G)VALHRPDVYLLPPAREQLNLRESATITCLVTGFSPAD VFVQWMQRGQPLSPEKYVTSAPMPEPQAPGRYFAHSIL TV SEEWNTGETYTCVVAHEALPNRVTERTVDKSTGKPTL <u>YN</u> <u>VSL</u> VMSDTAGTCY

Os polipeptídeos de região de articulação de imunoglobulina ocorrem naturalmente

em imunoglobulinas das classes de IgG, IgA, e IgD. Uma grande diferença estrutural entre IgG₁, IgG₂, IgG₃, e IgG₄ é o comprimento da região de articulação. Na cadeia pesada de imunoglobulina, os polipeptídeos de região de articulação de imunoglobulina do tipo selvagem são situados entre as regiões CH1 e CH2 e contêm resíduos de cisteína que são responsáveis pela formação de ligações dissulfeto intercadeia.

Como é conhecido na técnica, apesar da tremenda diversidade geral nas seqüências de amino ácido de imunoglobulina, a estrutura primária de imunoglobulina exibe um alto grau de conservação de seqüência em porções particulares das cadeias de polipeptídeo de imunoglobulina, notavelmente com relação à ocorrência dos resíduos de cisteína os quais, em virtude de seus grupos sulfidril, oferecem potencial para a formação de ligação dissulfeto com outros grupos sulfidril disponíveis. Assim, no contexto da presente invenção, os polipeptídeos de região de articulação de imunoglobulina do tipo selvagem incluem aqueles que caracterizam um ou mais resíduos de cisteína altamente conservados. A seqüência de polipeptídeo de região de articulação de IgGa humana de tipo selvagem compreende três resíduos de cisteína não adjacentes, referidos como a primeira cisteína da região de articulação de tipo selvagem, uma segunda cisteína da região de articulação de tipo selvagem e a terceira cisteína da região de articulação de tipo selvagem, respectivamente, prosseguindo ao longo da seqüência de região de articulação a partir do polipeptídeo N-terminal em direção do C-terminal.

As regiões Fc IgA, IgD, e IgG de imunoglobulina compreendem um único domínio CH2 e um único domínio CH3 enquanto que as regiões Fc de IgE e IgM compreendem um único domínio CH2 e um único domínio CH3, e uma única cadeia CH4. Embora o percentual de identidade entre as quatro subclasses de regiões Fc IgG (isto é, IgG₁, IgG₂, IgG₃, e IgG₄) esteja em um excesso de 95%, as referidas regiões são dotadas de especificidades de ligação a FcγR dramaticamente diferentes (ver tabela 2, abaixo).

Tabela 2

Especificidade de Reconhecimento de Receptor Fcγ humano relativo entre as subclasses de imunoglobulina IgG

	IgG₁	IgG₂	IgG₃	IgG₄
FcγRI	+++	-	+++	++
FcγRII	+	-	+	-
FcγRIII	+	-	+	-

Em algumas modalidades, as proteínas de ligação da presente invenção são capazes de citotoxicidade celular anticorpo dependente (ADCC), citotoxicidade celular dependente de complemento (CDC) e/ou fixação de complemento. A presente invenção

oferece vantagens inesperadas associadas à retenção pelas proteínas de ligação descritas aqui da habilidade de mediar ADCC e/ou CDC e/ou fixação de complemento independente de qualquer alteração na afinidade e/ou especificidade de ligação da proteína de ligação para um ou mais receptor cognato e/ou não cognato. A manipulação das seqüências que codificam os domínios de região constante é referenciada em Morrison e Oi, patente U.S. No. 6,218,149.

Mutações de Inserção de amino ácido que alteram a Afinidade e/ou especificidade de ligação de Fcγ-Receptor de imunoglobulina com base em IgG

Em um aspecto, a presente invenção proporciona proteínas de ligação, em particular proteínas de ligação que compreendem um ou mais domínios CH2 e/ou CH3 de articulação de cadeia pesada de imunoglobulina, onde a proteína de ligação é modificada de modo que se liga com afinidade e/ou especificidade de ligação alterada (isto é, aumentada ou reduzida) a um ou mais receptor Fc específico para imunoglobulina. As proteínas de ligação proporcionadas aqui ainda incluem aqueles onde um ou mais resíduos de amino ácidos é inserido em uma ou mais seqüências de amino ácido na região constante. Em um aspecto, um ou mais resíduos de amino ácidos é inserido em uma ou mais seqüências de amino ácido que fazem contato direto com um receptor, uma ou mais seqüências de amino ácido que são adjacentes à seqüência de amino ácido que faz contato direto com um receptor, uma ou mais seqüências de amino ácido distais a partir da seqüência de amino ácido que faz contato direto com um receptor, ou varias combinações das referidas seqüências. Os resíduos de amino ácidos inseridos podem introduzir uma mudança adaptável localizada ou geral na estrutura tridimensional da imunoglobulina que altera a afinidade e/ou especificidade de ligação a um receptor cognato.

Em determinadas modalidades, os resíduos de amino ácido inseridos compreendem uma seqüência de amino ácido que é idêntica a uma seqüência de amino ácido existente em um domínio CH2 e/ou CH3 de articulação de proteína de ligação que faz contato direto com um receptor cognato com a ligação. Em uma modalidade, uma ou mais seqüências de amino ácido que fazem contato direto com o receptor são posicionadas em balanço com relação à posição da seqüência de amino ácido de ligação de receptor do tipo selvagem. "tipo selvagem" como usado no presente contexto se refere à seqüência de amino ácido de uma proteína de ligação na qual mudanças devem ser introduzidas ou na seqüência de nucleotídeo do polinucleotídeo que codifica a proteína de ligação.

Em um outro aspecto, a proteína de ligação inclui uma ou mais seqüências de ligação de receptor inseridas idênticas à seqüência de ligação de receptor de tipo selvagem de uma proteína de ligação em um campo que é distal a partir de e na mesma cadeia que a seqüência de ligação de receptor de tipo selvagem e/ou ao campo em uma cadeia na proteína de ligação na qual a seqüência de ligação de receptor de tipo selvagem não está

localizada, ou ambos. Independente da natureza precisa e da inserção da seqüência de amino ácido, modificações deste tipo são bem conhecidas e rotineiramente praticadas na técnica como descrito em Sambrook *et al.*, "Protocols in Molecular Biology," *supra*.

Exemplificadas aqui estão as proteínas de ligação, em particular as proteínas de
 5 ligação que compreendem um ou mais domínios CH2 e/ou CH3 de articulação de cadeia pesada IgG, onde a proteína de ligação é modificada de tal forma que a mesma se liga com afinidade e/ou especificidade de ligação alterada (isto é, aumentada ou reduzida) a um ou mais receptor Fc imunoglobulina específico incluindo, mas não limitado a, um ou mais dos receptores imunoglobulina-específicos de IgG FcγRI (CD64), FcγRII (CD32), e/ou FcγRIII (CD16). As proteínas de ligação deste tipo incluem, por exemplo, as proteínas de ligação
 10 onde um ou mais amino ácidos é inserido na seqüência de amino ácido primária da proteína de ligação, dentro da articulação do domínio CH2 e/ou CH3, nas seqüências que são responsáveis para a ligação a Fcγ-receptor. As referidas mudanças incluem, mas não são limitados a, inserção de um ou mais amino ácidos entre e/ou adjacente aos amino ácidos
 15 que contribuem para o contato direto com a associação de uma proteína de ligação com um ou mais receptor Fc imunoglobulina específico(s) incluindo FcγRI (CD64), FcγRII (CD32), e/ou FcγRIII (CD16).

As modalidades específicas dos referidos aspectos da presente invenção incluem as proteínas de ligação que compreendem um ou mais domínios de CH2 IgG onde o
 20 domínio CH2 é um domínio CH2 de IgG1 e/ou IgG3. Algumas das referidas modalidades proporcionam proteínas de ligação que compreendem uma ou mais deleções de amino ácidos e/ou inserção de amino ácido dentro da estrutura de alça proximal da articulação, L-L-G-G-P, do domínio CH2 de IgG1 e/ou IgG3. Especificamente exemplificado aqui estão as proteínas de ligação que compreendem inserções simples de um único amino ácido nas
 25 posições indicadas pelo "*" dentro da estrutura de alça proximal de articulação a seguir. Assim, proporcionadas aqui estão as proteínas de ligação que compreendem as estruturas de alça proximal de articulação modificada L-L*-G-G-P, L-L-G*-G-P, e L-L-G-G*-P. Também proporcionadas aqui estão as proteínas de ligação que compreendem inserções simples de dois ou mais amino ácidos nas posições indicadas pelo "*" dentro da estrutura de
 30 alça proximal de articulação L-L*-G-G-P, L-L-G*-G-P, e L-L-G-G*-P. assim, nas referidas modalidades, "*" indica a inserção de pelo menos 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, ou 20 amino ácidos. Tipicamente, os amino ácidos adequados para a geração de proteínas de ligação dotadas das referidas estruturas de alça proximais de articulação modificadas são selecionadas a partir do grupo que consiste em Ala, Gly, Ile,
 35 Leu, e Val.

Outras modalidades proporcionam proteínas de ligação que compreendem domínios de CH2 IgG onde o domínio CH2 é um domínio CH2 de IgG1, IgG2 e/ou IgG3.

Algumas das referidas modalidades proporcionam proteínas de ligação que compreendem uma ou mais deleções de amino ácidos e/ou inserção de amino ácido dentro da estrutura de alça BC, D-V-S-H-E, do domínio CH2 de IgG1, IgG2 e/ou IgG3. Especificamente exemplificado aqui estão as proteínas de ligação que compreendem inserções simples de um único amino ácido nas posições indicadas pelo “*” dentro da estrutura de alça BC a seguir. Assim, proporcionadas aqui estão as proteínas de ligação que compreendem as estruturas de alça BC D-V-*-S-H-E e D-V-S-*-H-E. Também, nas referidas modalidades, “*” indica a inserção de pelo menos 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, ou 20 amino ácidos. Tipicamente, os amino ácidos adequados para a geração de proteínas de ligação dotadas das referidas estruturas de alça BC modificadas são selecionadas a partir do grupo que consiste em Ala, Gly, Ile, Leu, e Val.

Ainda outras modalidades proporcionam proteínas de ligação que compreendem um ou mais domínios de CH2 IgG onde o domínio de CH2 é um domínio de CH2 de IgG₁ e/ou IgG₃. Algumas das referidas modalidades proporcionam proteínas de ligação que compreendem uma ou mais deleções de amino ácidos e/ou inserção de amino ácido dentro da estrutura de alça FG, A-L-P-A-P-I, do domínio CH2. Especificamente exemplificado aqui estão as proteínas de ligação que compreendem inserções simples de um único amino ácido nas posições indicadas pelo “*” dentro da estrutura de alça FG a seguir. Assim, proporcionadas aqui estão as proteínas de ligação que compreendem as estruturas de alça FG A-L-*-P-A-P-I, A-L-P-*-A-P-I, e A-L-P-A-*-P-I. Também proporcionadas aqui estão as proteínas de ligação que compreende inserções simples de dois ou mais amino ácidos nas posições indicadas “*” dentro das estruturas de alça FG A-L-*-P-A-P-I, A-L-P-*-A-P-I, e A-L-P-A-*-P-I. Assim, nas referidas modalidades, “*” indica a inserção de pelo menos 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, ou 20 amino ácidos. Tipicamente, os amino ácidos adequados para a geração de proteínas de ligação dotadas das referidas estruturas de alça FG modificadas são selecionadas a partir do grupo que consiste em Ala, Gly, Ile, Leu, e Val.

O espaçamento, em termos de número de resíduos de amino ácido intervenientes, entre uma primeira seqüência de ligação de receptor inserido e uma segunda seqüência de ligação de receptor inserido e a terceira seqüência de ligação de receptor inserido e assim por diante, pode variar entre zero (0) resíduos de amino ácido intervenientes e cerca de 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50 ou mais resíduos de amino ácido.

O número exato de resíduos de amino ácido intervenientes, se presentes, entre a primeira seqüência de ligação de receptor inserido e a segunda seqüência de ligação de receptor inserido e a terceira seqüência de ligação de receptor inserido irá variar de modo a

aumentar a afinidade de ligação do receptor. Nas proteínas de ligação modificadas compreendendo mais de dois campos de ligação de receptor, o número de resíduos de amino ácido intervenientes entre as seqüências de ligação de receptor pode ser o mesmo ou pode ser diferente. Os resíduos de amino ácido intervenientes nas regiões espaçadoras
5 podem ser especificamente selecionados ou podem ser aleatoriamente selecionados ao se testar a afinidade de ligação.

Em uma modalidade exemplificativa, a funcionalidade da proteína de ligação, por exemplo, a funcionalidade do produto G-SMIPTM para aumentar ou diminuir a ligação de FcγRI (CD64), ligação de FcγRII (CD32), e/ou ligação de FcγRIIIa (CD16). Em
10 determinados aspectos das referidas modalidades exemplificativas, as referidas mudanças na funcionalidade da imunoglobulina são eficazes no aumento ou na redução, respectivamente, da citotoxicidade celular dependente de anticorpo correspondente (ADCC). Em determinadas modalidades, a proteína de ligação é um produto G-SMIP onde a funcionalidade é alterada, como descrito acima, ao se inserir e/ou deletar uma seqüência de
15 amino ácido dentro das alças Fcγ. Nas modalidades relacionadas, a proteína de ligação é um produto G-SMIP onde a funcionalidade é alterada ao se mudar os contatos da alça com FcγR e/ou C1q. Por exemplo, os amino ácidos podem ser inseridos e/ou deletados para alterar a face de ligação para FcγRs ou para diminuir a CDC ao se reduzir a ligação C1q.

A inserção de resíduos de amino ácido em uma seqüência de amino ácido de
20 proteína de ligação pode ser direcionada, por exemplo, através de uma ou mais mutações de inserção dentro de um polinucleotídeo que codifica a seqüência de amino ácido de imunoglobulina, ou através de mutações aleatórias nas regiões específicas como descrito aqui.

A ligação FcγRI, ligação FcγRII, ligação FcγRIII, e ligação FcαRIII podem ser
25 avaliadas ao se medir, respectivamente, a ligação a CD64, CD32, CD16, e CD89 pela metodologia bem conhecida na técnica e como descrito em maiores detalhes aqui abaixo.

Mutações que compreendem as seqüências de glicosilação que alteram a afinidade e/ou especificidade de ligação de Fcγ-Receptor de Imunoglobulina com base em IgG

As proteínas de ligação da presente invenção, como descritas aqui, podem, de
30 acordo com determinadas modalidades, desejavelmente compreender campos adicionais de glicosilação, por exemplo, fixação covalente de frações carboidrato, tais como, por exemplo, monossacarídeos ou oligossacarídeos. A incorporação de seqüências de amino ácido que proporcionam substratos para a glicosilação de polipeptídeo está incluída no âmbito da técnica relevante, incluindo, por exemplo, o uso de metodologias de engenharia genética ou
35 de engenharia de proteínas para se obter a seqüência de polipeptídeo contendo, por exemplo, o campo Asn-X-Ser/Thr clássico para a glicosilação N-(asparagina) ligada, ou uma seqüência contendo resíduos Ser ou Thr que são substratos adequados para a glicosilação

O-ligada ou as seqüências capazes de C-manosilação, modificação glipiação/glicosilfosfatidilinositol, ou fosfoglicação, todos os quais são identificados de acordo com os critérios estabelecidos na técnica (*por exemplo*, Spiro, *Glybiology* 12:43R (2002)).

5 Acredita-se que a glicosilação N-ligada da alça DE CH2 de imunoglobulina altere a conformação de CH2 e proporcione contato direto do açúcar com a FcγR. As modificações dentro das glicoformas de imunoglobulina podem ser alcançadas ao se inserir uma ou mais seqüências de amino ácido compreendendo um campo de glicosilação N-ligado tal como, por exemplo, a seqüência de amino ácido YNSTY. As referidas novas glicoformas podem
10 apresentar propriedades de ligação FCγR alteradas. Em um aspecto alternativo das referidas modalidades, um segundo campo de glicosilação N-ligado pode ser inserido na alça DE CH2. Por exemplo, a seqüência do tipo selvagem YNSTY pode ser convertida em YNSTYNSTY. As referidas modificações de imunoglobulina irão substancialmente afetar a ligação FcγR e, conseqüentemente, a citotoxicidade celular dependente de anticorpo
15 (ADCC).

Foi mostrado que a glicosilação N-ligada, em particular a glicosilação N-ligada na posição de amino ácido Asn297, é essencial para a ligação às imunoglobulinas da classe IgG aos seus receptores de Fcγ cognatos. Assim, por exemplo, a mutação de Asn297 em Ala297 foi mostrada para abolir o reconhecimento de FcγRI. Foi similarmente mostrado que,
20 na ausência do oligossacarídeo N-ligado na posição Asn297, o reconhecimento e/ou ativação de FcγRI, FcγRII, FcγRIII (assim como do complemento C1q) é abolido enquanto que a proteína A e a ligação do fator reumatóide não são afetados. As seqüências de glicosilação O-ligada são bem conhecidas na técnica como descrito, por exemplo, em Gooley *et al.*, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 178:1194-1201 (1991) e Pisano *et al.*,
25 *Glycobiology* 3:429-435 (1993).

Em determinados aspectos, a presente invenção proporciona modificações que incluem a inserção de um ou mais amino ácidos em e/ou a deleção de um ou mais amino ácidos a partir de uma ou mais região de articulação e/ou região constante de alça(s) de imunoglobulina compreendendo um ou mais campo(s) de glicosilação O- e/ou N-ligadas.

30 Assim, a presente invenção proporciona proteínas de ligação, em particular proteínas de ligação compreendendo um ou mais domínios CH2 e/ou CH3 de articulação de cadeia pesada, onde a proteína de ligação compreende uma ou mais modificação(ões) dentro de um ou mais domínios CH2 e/ou CH3 de articulação de cadeia pesada onde a modificação compreende a inserção de uma ou mais seqüência de glicosilação N-ligada(s) e/ou um ou mais seqüência de glicosilação O-ligada(s), cuja seqüência de glicosilação é
35 suficiente para alcançar a glicosilação N- e/ou O-ligada na posição de inserção deste modo alterando (isto é, seja aumentando ou diminuindo) a afinidade e/ou especificidade de ligação

da proteína de ligação a um ou mais receptores Fc imunoglobulina-específico ou outra proteína alvo. As proteínas de ligação deste tipo incluem, por exemplo, aquelas compreendendo as mudanças na seqüência amina primária nas posições que são proximais e/ou distais às regiões, domínios, e/ou estruturas de alça responsáveis pela glicosilação na

5 proteína de ligação não modificada.

Exemplificadas aqui estão as proteínas de ligação que compreendem um ou mais domínios CH2 e/ou CH3 de articulação de cadeia pesada IgG, onde as proteínas de ligação compreendem uma ou mais modificação(ões) dentro de um ou mais domínios CH2 e/ou CH3 de articulação de cadeia pesada IgG onde a modificação compreende a inserção de

10 uma ou mais seqüência(s) de glicosilação N-ligada(s) e/ou uma ou mais seqüência de glicosilação O-ligada, cuja seqüência de glicosilação é suficiente para alcançar a glicosilação N- e/ou O-ligada na posição de inserção deste modo alterando (isto é, seja aumentando ou reduzindo) a afinidade e/ou especificidade de ligação da proteína de

15 ligação a um ou mais Receptor(es) específico(s) para imunoglobulina IgG FcγRI (CD64), FcγRII (CD32), e/ou FcγRIII (CD16) em comparação a uma proteína de ligação correspondente compreendendo um ou mais domínios CH2 e/ou CH3 de articulação de cadeia pesada IgG não modificados.

As modalidades específicas dos referidos aspectos da presente invenção incluem proteínas de ligação compreendendo um ou mais domínios de articulação de IgG, um ou

20 mais domínios de CH2 IgG, e/ou um ou mais domínios de CH3 IgG onde o domínio CH2 e/ou CH3 da articulação, é um domínio CH2 e/ou CH3 de articulação IgG1, um domínio CH2 e/ou CH3 de articulação IgG2, um domínio CH2 e/ou CH3 de articulação IgG3, e/ou um domínio CH2 e/ou CH3 de articulação IgG4. Algumas das referidas modalidades proporciona proteínas de ligação compreendendo a inserção de uma ou mais seqüência de

25 glicosilação N-ligada N-X-(S/T) (onde X é qualquer amino ácido) e/ou uma ou mais seqüência de glicosilação O-ligada X-P-X-X (onde pelo menos um X é T), T-X-X-X (onde pelo menos um X é T), X-X-T-X (onde pelo menos um X é R ou K), e/ou S-X-X-X (onde pelo menos um X é S)) proximal a e/ou distal ao campo de glicosilação N-ligada ou de glicosilação O-ligada no domínio CH2 e/ou CH3 de imunoglobulina IgG nativo

30 correspondente de articulação IgG1. Em determinados aspectos das referidas modalidades, a proteína de ligação exibe uma afinidade e/ou especificidade de ligação a FcγR alterada (isto é, aumentada ou reduzida).

Exemplificadas aqui estão as referidas modalidades onde as proteínas de ligação compreendem um ou mais domínios de articulação de IgG, um ou mais domínios de CH2

35 IgG, e/ou um ou mais domínios de CH3 IgG e onde as proteínas de ligação adicionalmente compreendem a inserção de uma ou mais seqüência de glicosilação N-ligada N-X-(S/T) (onde X é qualquer amino ácido). Por exemplo, a presente invenção proporciona as

referidas proteínas de ligação que compreendem uma inserção de uma ou mais seqüências N-X-(S/T) adjacentes à seqüência N-S-T nativa dentro da alça DE de um ou mais domínios CH2 IgG₁, IgG₂, IgG₃, e/ou IgG₄. Em determinados aspectos das referidas modalidades, a proteína de ligação exibe uma afinidade e/ou especificidade de ligação a FcγR alterada (isto é, aumentada ou reduzida).

Em modalidades específicas, a seqüência de glicosilação N-ligada dentro da alça DE de um ou mais domínios CH2 IgG₁, IgG₂, IgG₃, e/ou IgG₄ compreende a seqüência de amino ácidos N-S-T e é inserida adjacente a e/ou dentro de 0 a 100 amino ácidos amino-terminal e/ou carbóxi-terminal para a seqüência N-S-T nativa de modo que a seqüência de amino ácido nativa X-N-S-T-Z é modificada em AA^a)-N-S-T-(AA^b)-N-S-T-(AA^c) onde cada um de AA^a, AA^b, e AA^c independentemente designa de 1 a 100 amino ácidos.

Nas modalidades específicas, a seqüência de glicosilação N-ligada dentro da alça DE de um ou mais domínios CH2 IgG₁, IgG₂, IgG₃, e/ou IgG₄ compreende a seqüência de amino ácido N-S-T e é inserida adjacente à seqüência N-S-T nativa de modo que a seqüência nativa de amino ácido X-N-S-T-Z é modificada para X-N-S-T-Z-N-S-T-Z, onde X e Z são independentemente selecionados a partir de Tyr (Y) e Phe (F).

Nas referidas modalidades alternativas, a seqüência de glicosilação N-ligada é inserida na alça BC de um ou mais domínios CH3 de IgG₁, IgG₂, IgG₃, e/ou IgG₄ compreende a seqüência de amino ácido N-S-T é inserida distal à seqüência nativa N-S-T de modo que a seqüência nativa de amino ácido Y-P-S-D-I-A é modificada para Y-P-N-S-T-D-I-A e Y-N-S-T-P-S-D-I-A.

Em um outro aspecto, a presente invenção proporciona proteínas de ligação, em particular proteínas de ligação que compreendem um ou mais domínios CH2 e/ou CH3 de articulação de cadeia pesada IgG, onde a proteína de ligação compreende uma ou mais modificação(ões) dentro de um ou mais domínios CH2 e/ou CH3 de articulação de cadeia pesada IgG onde a modificação compreende a inserção de uma ou mais seqüências de glicosilação N-ligada(s) e/ou um ou mais seqüências de glicosilação O-ligadas, cuja seqüência de glicosilação é suficiente para alcançar a glicosilação N- e/ou O-ligada na posição de inserção deste modo alterando (isto é seja aumentando ou reduzindo) a afinidade e/ou especificidade de ligação da proteína de ligação a um ou mais receptores Fc imunoglobulina-específico incluindo os receptores IgG imunoglobulina-específicos FcγRI (CD64), FcγRII (CD32), e/ou FcγRIII (CD16) em comparação à proteína de ligação correspondente compreendendo um ou mais domínios CH2 e/ou CH3 de articulação de cadeia pesada IgG não modificados. As proteínas de ligação deste tipo incluem, por exemplo, aquelas compreendendo as mudanças na seqüência amino primária em posições que são proximais e/ou distais às regiões, domínios e/ou estruturas de alça responsáveis para a glicosilação na proteína de ligação não modificada.

As referidas mudanças incluem, por exemplo, a inserção de três ou mais amino ácidos compreendendo a seqüência YNS para a glicosilação N-ligada entre e/ou adjacente aos amino ácidos que com a ligação estão em contato com um ou mais receptores Fc imunoglobulina-específicos incluindo FcγRI (CD64), FcγRII (CD32), e/ou FcγRIII (CD16).

- 5 Um aspecto da modalidade atualmente descrita proporciona modificações dentro da alça DE do domínio CH2 da classe IgG de imunoglobulinas referidas como produtos G-SMIP™, que contêm uma ou mais seqüência de amino ácido YNSTY que é um campo para a glicosilação N-ligada e para os contatos de FcγR.

10 Proteínas de ligação tanto dotada de Especificidades de ligação de Receptor cognato como de Receptor não cognato

- Dentro ainda de aspectos adicionais, a presente invenção fornece proteínas de ligação, onde uma funcionalidade nova é conseguida substituindo uma ou várias alças de imunoglobulina de uma primeira classe da imunoglobulina com uma ou várias segundas alça de imunoglobulina de uma segunda classe de imunoglobulina onde o segundo alça de imunoglobulina proporciona uma especificidade de ligação nova à proteína de ligação modificada que não está presente na proteína de ligação não modificada correspondente.

- Proteínas de ligação de acordo com os referidos aspectos da presente invenção compreendem uma ou mais articulações de cadeia pesada, domínio de CH2, e/ou CH3 de uma primeira classe da imunoglobulina (*isto é*, IgA, IgD, IgE, IgG, ou IgM), na qual a proteína de ligação é modificada (*isto é*, por substituição de amino ácido e/ou inserção de amino ácido) na seqüência primária de amina de uma ou mais articulações de cadeia pesada, Domínio de CH2, e/ou CH3, da primeira classe da imunoglobulina para gerar a proteína de ligação capaz de se ligar a um ou mais receptor Fc cognato de uma segunda classe de imunoglobulina distinta da primeira classe de imunoglobulina. As referidas modificações incluem, por exemplo, a substituição e/ou remodelagem de um ou mais alças, ou de suas porções de amino ácido e/ou peptídeo, de um primeiro domínio de imunoglobulina com uma ou mais alças, ou de suas porções de amino ácido e/ou peptídeo, de um segundo domínio de imunoglobulina, na qual o segundo domínio de imunoglobulina compreende um ou mais amino ácidos que formam pelo menos uma porção de uma seqüência de ligação para um segundo receptor Fc específico de imunoglobulina. Proteínas de ligação de acordo com os referidos aspectos da presente invenção têm a capacidade de especificamente se ligar a FcαR além de ser capaz de especificamente se ligar a FcγRI, FcγRII, e/ou FcγRIII.

- Estão exemplificadas aqui proteínas de ligação compreendendo um ou mais domínio de CH2, e/ou CH3 de articulações de cadeia pesada IgG, no qual a proteína de ligação é modificada para se ligar a um ou mais receptor Fc específico de imunoglobulina não-IgG incluindo, mas não limitado ao receptor Fc específico de imunoglobulina IgA

(CD89). Proteínas de ligação do referido tipo incluem, por exemplo, proteínas de ligação compreendendo modificações (isto é, substituição de amino ácido e/ou inserção de amino ácido) na seqüência primária de amina de um ou mais domínio CH2 e/ou CH3 de articulação de cadeia pesada IgG, para gerar seqüências de amino ácido capazes de ligar o receptor Fc específico de imunoglobulina não-IgG tais como, por exemplo, ligação de receptor de Fc α .

Nas referidas modalidades são proporcionadas proteínas de ligação compreendendo um ou mais domínio CH2 e/ou CH3 de articulação de cadeia pesada IgG, no qual a proteína de ligação é modificada para se ligar ao receptor Fc específico de imunoglobulina IgA (CD89). As referidas proteínas de ligação exemplificativas compreendem uma ou mais substituição de amino ácido dentro da alça de FG CH3 IgG e/ou um ou mais substituição de amino ácido dentro da alça de CD CH3 IgG.

Por exemplo, a referida proteína de ligação exemplificativa compreende a substituição da alça de FG CH3 IgG compreendendo a seqüência de amino ácido C-S-V-M-H-E-A-L-H-N-H-Y-T-Q, ou uma porção do referido, com o alça de FG CH3 IgA compreendendo a seqüência de amino ácido C-M-V-G-H-E-A-L-P-L-A-F-T-Q, ou uma correspondente porção do referido.

Outra proteína de ligação exemplar compreende a substituição da alça de CD CH3 IgG compreendendo a seqüência de amino ácido Q-P-E-N, ou uma porção do referido, com a alça de CD CH3 IgA compreendendo a seqüência de amino ácido Q-E-L-P-R-E, ou uma porção do referido.

Ainda outra referida proteína de ligação exemplar compreende uma substituição tanto da alça de FG CH3 IgG compreendendo a seqüência de amino ácido C-S-V-M-H-E-A-L-H-N-H-Y-T-Q, ou uma porção do referido, com o alça de FG CH3 IgA compreendendo a seqüência de amino ácido C-M-V-G-H-E-A-L-P-L-A-F-T-Q, ou uma correspondente porção do referido, e a alça de CD CH3 IgG compreendendo a seqüência de amino ácido Q-P-E-N, ou uma porção do referido, com o alça de CD CH3 IgA compreendendo a seqüência de amino ácido Q-E-L-P-R-E, ou uma porção do referido.

Qualquer uma das modalidades de proteína de ligação acima mencionadas pode, além disso, compreender a substituição de CH3 amino ácido Met de cadeia pesada IgG (na posição de amino ácido CH3 no. 28 dentro da seqüência K-D-T-L-M₂₈-I-S-R-T) com amino ácido Leu de modo que a proteína de ligação, além disso, compreende a seqüência de amino ácido K-D-T-L-L₂₈-I-S-R-T. Alternativa ou adicionalmente, qualquer uma das modalidades de proteína de ligação acima mencionadas pode, além disso, compreender a substituição do amino ácido CH3 de cadeia pesada IgG Glu (na posição de amino ácido CH3 no. 157 dentro da seqüência D-I-A-V-E₁₅₇-W-E-S-N) com amino ácido Arg de modo que a proteína de ligação, além disso, compreende a seqüência de amino ácido D-I-A-V-R₁₅₇-W-E-S-N.

Exemplificada aqui, com certas modalidades, um alça compreendendo um contato de ligação para um não- FcγR é inserido na proteína de ligação com base em IgG compreendendo um ou mais domínio CH2 e/ou CH3 de articulação de cadeia pesada IgG, na qual as proteínas de ligação são modificadas para se ligar a um ou mais receptores Fc específico de imunoglobulina não-IgG incluindo, mas não limitado ao IgA receptor Fc específico de imunoglobulina FcαR (CD89). Proteínas de ligação do referido tipo incluem, por exemplo, proteínas de ligação compreendendo uma ou mais mudanças (isto é, substituição de amino ácido e/ou inserção de amino ácido) na seqüência primária de amina de um ou mais domínio CH2 e/ou CH3 de articulação de cadeia pesada IgG, para gerar seqüências de amino ácido capazes de ligar o receptor Fc específico de imunoglobulina não-IgG tais como, por exemplo, ligação de receptor de Fcα. As referidas modificações incluem, por exemplo, a substituição e/ou remodelagem de um ou mais alça de imunoglobulina IgG com um ou mais alça de imunoglobulina não-IgG e/ou porções de peptídeo, na qual a alça de imunoglobulina não-IgG compreende a seqüência de ligação para um receptor Fc específico de imunoglobulina não-IgG.

Em certas modalidades, a proteína de ligação é um produto G-SMIP no qual a funcionalidade do produto G-SMIP é alterada de modo que o produto G-SMIP se liga a um ou mais FcαR tais como CD89. Várias alças no domínio de CH3 de IgG são projetadas, como descrito acima, para fornecer interações moleculares modificadas e/ou novas. Por exemplo, amino ácidos CH2 e/ou CH/3 de articulação IgG, podem ser substituídos com articulação IgA, CH2, e/ou resíduos de CH3 que participam da ligação entre IgA e FcαR. Por exemplo, e como descrito acima para proteínas de ligação, geralmente, a alça de FG CH3 IgG pode ser substituída com um alça de FG CH3 IgG mais outro amino ácidos que entra em contato com FcαR. Alternativa ou adicionalmente, a alça de CD CH3 IgG pode ser substituída com a alça de CD CH3 IgA mais outros amino ácidos que entram em contato com o FcαR. produtos G-SMIPs Exemplares compreendem uma extremidade amino terminal do anticorpo humano chamado 2H7-018014. Produtos G-SMIP™ compreendendo, por exemplo, amino ácidos que conferem atividade de ligação FcαR retêm os benefícios do produto não-modificado SMIP™ de base G tal como, por exemplo, longa meia-vida *in vivo*, de fácil purificação por proteína A, e/ou funções efetoras IgG.

Ainda, além disso, as modalidades proporcionam modificações na especificidade da proteína de ligação para ligação de receptor não-anticorpo tais como, por exemplo, se ligar uma proteína de superfície de célula T; B proteínas de superfície de célula; proteínas de superfície de célula mielóide; e proteínas de célula não imune.

Metodologia para a geração, expressão, e funcionalidades caracterizantes de Proteínas de ligação dotadas de função efetora alterada

Uma vez que a proteína de ligação, como proporcionada aqui, tenha sido projetada,

polinucleotídeos incluindo codificação de DNA, a proteína de ligação pode ser sintetizada total ou parcialmente via síntese de oligonucleotídeo como descrito, por exemplo, em Sinha *et al.*, *Nucleic Acids Res.*, 12:4539-4557 (1984); montada via PCR como descrito, por exemplo, em Innis, *Ed.* "PCR Protocols" (Academic Press, 1990) e também em Better *et al.*, *J Biol. Chem.* 267:16712-16118 (1992). A metodologia para o seqüenciamento, clonagem, e expressão das referidas proteínas de ligação modificadas e não-modificadas são conhecidos no método por referência, por exemplo, a procedimentos como descrito em Ausubel *et al.*, *Eds.* "Current Protocols in Molecular Biology" (John Wiley & Sons, New York, 1989) e também em Robinson *et al.*, *Hum. Antibod. Hybridomas* 2:84-93 (1991). As proteínas de ligação da presente invenção podem ser expressas em uma linhagem de célula eucariota (tais como, por exemplo, uma linhagem de célula CHO), purificadas via cromatografia de Proteína A, e caracterizadas por ensaios funcionais.

A expressão pode ser alcançada em qualquer sistema de expressão mamífero convencional conhecido no método pelo isolamento de fragmento DNA codificando a proteína de ligação de interesse e clonando em um vetor mamífero de expressão tais como, por exemplo, pD18. DNA a partir de clones positivos pode ser amplificado usando kits de preparação plasmídeo QIAGEN (QIAGEN, Valencia, CA). O DNA de recombinação do plasmídeo pode ser tornado linear em uma região do não essencial pela digestão com uma endonuclease apropriada de limitação, purificado pela extração do fenol, e resuspenso em meios de cultura do tecido (por exemplo, Excell 302; Catalog # 14312-79P, JRH Biosciences, Lenexa, KS). Células adequadas para transfecção são, por exemplo, células CHO DG44, tipicamente em estágio de crescimento logarítmico. As células são colhidas para cada reação de transfecção e DNA linearizado é adicionado às células para a transfecção ou electroporação. Por exemplo, a produção estável das proteínas de ligação da presente invenção pode ser alcançada por electroporação de células CHO com um plasmídeo selecionável e amplificável, tais como pD18, contendo o cDNA codificando a proteína de ligação sob o controle do promotor de CMV. (todas as linhas de células estão disponíveis a partir da American Type Culture Collection; Manassas, VA). Um cassete de expressão compreendendo a proteína de ligação cDNA pode ser subclonada a jusante de um promotor adequado (tal como o promotor de CMV).

Células transfeccionadas podem se recuperar durante a noite em um meio não-seletivo antes da distribuição seletiva em uma placa inferior lisa de 96 cavidades (Costar) em variar as diluições de série que variam, por exemplo, de 125 células/cavidade a 2000 células/cavidade com meio de cultura adequado para célula clonando tais como meio completo Excell 302, contendo agentes seletivos (tais como, por exemplo, 100 nM metotrexato no caso de resistência a DHFR). Diluições seriais de sobrenadantes da cultura a partir de cavidades master são selecionadas para se ligar a células expressando a

relevante liga da proteína de ligação.

Os sobrenadantes são tipicamente coletados a partir de células CHO expressando a proteína de ligação, filtradas através de filtros de 0.2 μm (Nalgene, Rochester, NY), e passadas por agarose de Proteína A (IPA 300 agarose reticulada) coluna (Repligen, Needham, MA). A coluna é lavada com PBS e a proteína de ligação é eluída usando 0.1 M de tampão citrato, pH 3. As frações são coletadas e a proteína eluída é neutralizada usando 1M Tris, pH 8.0, antes da diálise no PBS. A concentração de proteína de ligação purificada pode ser determinada por absorção a 280 nm.

As Proteínas de ligação podem ser testadas para atividades desejadas, por exemplo, se ligar a um alvo receptor tal como Fc γ RI, Fc γ RII, Fc γ RIII e/ou Fc α R, ou atividade de ligação de antígeno específico, como descrito, por exemplo, em Harlow *et al.*, Eds. "Antibodies: A Laboratory Manual" Chapter 14 (Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, 1988) e Munson *et al.*, *Anal. Biochem.*, 107:220-239 (1980) bem como em citotoxicidade mediada por célula dependente de anticorpo (ADCC) e citotoxicidade dependente de complemento (CDC) por métodos conhecidos no método. Os ensaios de ADCC e CDC, respostas secundárias de anticorpo *in vitro*, fluxo de análise imunocitofluorimétrica de vários subpopulações de células de sangue periférico ou linfóide mononuclear usando sistemas de marcação por antígenos de cavidade, imunohistoquímica, e outros ensaios relevantes são, por exemplo, todos proporcionados aqui por referência a Rose *et al.* Eds. "Manual of Clinical Laboratory Immunology" (American Society de Microbiology, Washington, DC, 1997).

A habilidade de proteínas de ligação para mediar ADCC pode ser medida usando qualquer alvo de linhagem de célula adequado e PBMCs que as células de efeito. Por exemplo, no específico caso de proteínas de ligação CD20 específicas, as linhagens adequadas de células incluem a linhagem de células B Ramos e Bjab. Efetoras para taxas de alvo são tipicamente variadas, por exemplo, como se segue: 100:1, 50:1, 25:1, e 10:1, com o número de células de alvo por cavidade permanecendo constante enquanto variando o número de PBMCs. As células de alvo são marcadas com ^{51}Cr (por exemplo, $\text{Na}_2^{51}\text{CrO}_4$) e separadas em alíquotas em uma densidade de célula de 5×10^4 células/cavidade para cada cavidade de uma placa de 96 cavidades. As proteínas de ligação purificadas são adicionadas na concentração de 10 $\mu\text{g/mL}$ para as várias diluições de PBMCs. A liberação espontânea é medida sem a adição de PBMC ou proteína de ligação, e a liberação máxima é medida pela adição de detergente (1% NP-40) nas cavidades apropriadas. As reações são incubadas e o sobrenadante da cultura é colhido por um contador de cintilação gama (por exemplo, Lumaplate; Packard Instruments). A lise total e espontânea é determinada incubando células alvo em 0.2% de SDS ou no meio completo, respectivamente. A porcentagem da lise é calculada pela fórmula:

$$\% \text{ de Lise} = \frac{\text{liberação na amostra} - \text{liberação espontânea}}{\text{liberação de lise total} - \text{liberação espontânea}} \times 100$$

A porcentagem de lise é expressa por LU que foi determinada usando a equação de ajuste exponencial descrita por Pross *et al.*, *J. Clin. Immunol.* 1:51-63 (1981). Uma unidade lítica é definida como o número de células efetoras necessárias para obter 20% de lise de células de alvo.

5 Os ensaios de citotoxicidade dependente de complemento (CDC) podem também ser realizados com células de alça marcadas com ^{51}Cr na presença de PBMCs (como descrito acima para ADCC). As células marcadas são tipicamente distribuídas a 2000 células/cavidade em uma placa de 96 cavidades contendo concentrações crescentes de proteína de ligação e então incubadas a 37°C por 1 h com complemento de coelho (Pei-
10 Freez, Rogers, AK) na diluição final de 1:100. Soro humano obtido a partir de doadores é adicionado às cavidades contendo as células alvo e incubadas a 37°C. O soro ativado por calor pode ser usado como um controle para assegurar a medição de lise de complemento específico. A lise específica de célula alvo é determinada como descrito acima para ADCC. A proteína de ligação mediada CDC é determinada por subtração da porcentagem de lise
15 célula alvo atribuível apenas ao complemento.

A ligação de Fc γ R pode ser analisada e determinada avaliando a ligação a FcIg solúvel (por exemplo, CD64Ig, CD32Ig, CD16Ig, e CD89Ig) e/ou nas células que expressam o receptor respectivo de Fc (isto é células CD64+, CD32+, CD16+, e CD89+). O acoplamento e a ativação de Fc γ R podem, por exemplo, ser medidos através da geração de
20 superóxido por leucócito (por exemplo, células U937).

Uso contemplado de proteína de ligação dotadas de função efetora alterada

As proteínas de ligação da presente invenção encontrarão utilidade em uma grande variedade de aplicações terapêuticas.

Como acima descrito, e como exemplificado abaixo, dentro de determinadas
25 modalidades, a presente invenção proporciona proteínas de ligação que compreendem uma inserção de um ou mais amino ácidos dentro da articulação de imunoglobulina, região CH2 e/ou CH3, onde a imunoglobulina exibe uma afinidade e/ou especificidade de ligação alterada (isto é, aumentada ou reduzida) para um ou mais de de Fc γ RI (CD64), Fc γ RII (CD32), e/ou Fc γ RIII (CD16).

30 Usos contemplados para a referida classe de proteína de ligação incluem, por exemplo, a depleção direcionada de populações de células (a) em pacientes com populações de células NK exterminadoras naturais baixa/hipofuncional e/ou (b) em pacientes que se beneficiam de potência aprimorada da proteína de ligação modificada. Usos alternativos contemplados para as referidas proteína de ligação incluem o tratamento

bacteriano, parasítico, e/ou de infecções virais onde um aumento ou uma redução na ligação de um FcγRI, FcγRII, e/ou FcγRIII aumenta a neutralização ou a depuração de patógenos. Alterações na referida atividade de ligação de FcγR será também útil para o tratamento de doenças infecciosas onde a infecção pode ser promovida por interações de anticorpo FcγR incluindo, mas não são limitados a, doenças tais como HIV-1.

Em modalidades alternativas são proporcionadas proteínas de ligação que compreendem uma inserção de uma ou mais seqüência de glicosilação N-ligada e/ou O-ligada (tal como, por exemplo, uma ou mais seqüência de glicosilação(s) N-X-(S/T) N-ligada e/ou um ou mais O-ligada X-P-X-X (onde pelo menos um X é T), T-X-X-X (onde pelo menos um X é T), X-X-T-X (onde pelo menos um X é R ou K), e S-X-X-X (onde pelo menos um X é S)) proximal a e/ou distal ao campo de glicosilação N-ligada e/ou O-ligada na região Fc de imunoglobulina nativa correspondente, onde a proteína de ligação exibe uma afinidade e/ou especificidade de ligação a FcγR alterada (isto é, aumentada ou reduzida), tal como afinidade e/ou especificidade de ligação alterada para C1q, FcγRI (CD64), FcγRII (CD32), e/ou FcγRIII (CD16).

Os usos contemplados para a referida classe de proteína de ligação são, dentro de determinados aspectos, com base em uma preservação de meia vida da proteína de ligação e a redução correspondente no potencial de reticulação. Por exemplo, a presente invenção contempla que as referidas proteínas de ligação modificadas encontram uso para o direcionamento preferencial de um ou mais de C1q, FcγRI (CD64), FcγRII (CD32), e/ou FcγRIII (CD16) com reticulação reduzida mediada a sinalização intracelular tal como sinalização de CD3 e/ou CD28. Usos alternativos contemplados para esta classe de proteína de ligação incluem a preservação da meia vida com potenciais mais baixos para a depleção celular e preservação da reticulação para uso quando a reticulação direciona os sinais desejados mas a depleção de células alvo não é desejada. Ex. Agonista SMIP para EPO-R.

Ainda outras modalidades da presente invenção proporcionam proteínas de ligação compreendendo a inserção e/ou a substituição de um ou mais amino ácidos dentro de uma região CH2 e/ou CH3 de imunoglobulina IgG onde a inserção e/ou a substituição de amino ácido compreende um ou mais amino ácido correspondendo a uma região CH2 e/ou CH3 de imunoglobulina IgA, onde o um ou mais amino ácido(s) de uma região CH2 e/ou CH3 de imunoglobulina IgA participam na ligação específica de uma imunoglobulina IgA com o seu receptor Fcα cognato e onde a proteína de ligação modificada é capaz de se ligar especificamente a FcαR.

Usos contemplados para esta classe de proteína de ligação incluem a depleção de célula alvo onde, por exemplo, uma proteína de ligação compreendendo uma combinação de uma ou mais região(s) CH2 e/ou CH3 IgG e uma ou mais região(s) CH2 e/ou CH3 IgA é

capaz de se ligar a um ou mais de CD16, CD32, e/ou CD64 assim como a CD89. As referidas proteínas de ligação permitirão o uso de efetoras polimorfonucleares (PMN) além de efetoras de célula exterminador natural (NK)/monócito para alcançar a eliminação das células alvo. As referidas alterações na especificidade de ligação para as proteínas de

5 ligação aqui descritas, irão assim, resultar na potência aprimorada e maior eficácia em uma faixa ampla de populações de pacientes.

Como observado acima com relação às proteínas de ligação que compreendem um ou mais amino ácido inserido em uma região CH2 e/ou CH3 de articulação de imunoglobulina de proteínas de ligação dotadas de especificidade de ligação para uma

10 combinação de uma ou mais regiões CH2 e/ou CH3 de IgG e/ou uma ou mais regiões CH2 e/ou CH3 de IgA, encontrarão uso no tratamento de infecções bacterianas, parasíticas, ou virais onde os aprimoramentos na ligação de FcγR e/ou de FcαR podem resultar em um aumento na neutralização de patógenos e/ou atividade de depuração. Alterações na ligação de FcγR e/ou de FcαR serão também úteis no tratamento de doenças infecciosas onde a

15 infecção pode ser promovida por interações FcR de anticorpos, tais como doenças associadas com infecção de HIV-1.

Os exemplos a seguir são oferecidos apenas como ilustração e não como limitação.

EXEMPLOS

Exemplo 1

20 Modificação de alças dentro de uma articulação de imunoglobulina e/ou domínio CH2 confere afinidade de ligação CdC aprimorada

Um membro da classe de IgG de anticorpos especificamente se ligam a CD16 (FcRγIII). As mudanças mutacionais dentro dos domínios de alça de um anticorpo IgG exemplificativo foram construídos para alterar a afinidade de ligação de IgG foram

25 construídos para alterar a afinidade de ligação de IgG para seu receptor cognato Fc CD16. Especificamente direcionados foram as quatro alças dos domínios IgG CH2 que entram em contato com a molécula em duas interfaces. Com base na estrutura de cristal descrita por Sondermann P. *et al.*, *Nature* 406(6793):267-73 (2000), uma primeira interface envolve a interação de CD16 com uma alça da região de articulação e a alça FG da cadeia Alfa de

30 CH2. Uma segunda interface envolve uma interação da molécula CD16 com uma alça de região de articulação, a alça BC, alça DE (isto é, uma alça de carboidrato), e a alça FG da cadeia beta de CH2. Ver figura 1 para um diagrama dos referidos campos de contato.

Mutagênese de inserção foi empregada para gerar mudanças nas duas interfaces dentro das três alças de carboidratos a seguir: (1) a alça de região de articulação, (2) a alça

35 BC, e (3) a alça FG. As bibliotecas das referidas mutações de inserção são adequados para a seleção de mutantes individuais dotados de uma afinidade de ligação desejada para um ou mais receptor FcR. As setas apontando para baixo na figura 2 indicam locais

representativos para a incorporação de inserções de aço de modo a alcançar mutantes de inserção de acordo com este aspecto da presente invenção.

As bibliotecas de mutantes de inserção foram construídas ao se inserir uma sequência de polinucleotídeo dentro da região de codificação para seqüências NWN dentro de cada região de articulação. As bibliotecas 1A, 1B e 1C foram produzidas com uma alça de região de articulação, as bibliotecas 2A e 2B foram produzidas na alça BC, e as bibliotecas 3A, 3B e 3C foram produzidas na alça FG. As bibliotecas contendo 96 membros totais foram construídas por inserção de 12 seqüências únicas em cada uma das diferentes 8 posições. Os amino ácidos dotados seja de cadeia longa ou de lado volumoso: fenilalanina (F), Leucina (L), Isoleucina (I), Metionina (M), Valina (V), Tirosina (Y), Histidina (H), Glutamina (Q), Asparagina (N), Lisina (K), ácido aspártico (D), e ácido glutâmico (E).

As seqüências de cDNA para cada uma das bibliotecas 1A, 1B, 1C, 2A, e 2B foram construídas usando um método de extensão de sobreposição de PCR utilizando 6 primers de oligonucleotídeo (as seqüências são proporcionadas na tabela 3). Os oligonucleotídeos para a geração da biblioteca 1A são Lib1A_F1, Lib1A_F2, Lib1A_F3, Lib1A_R1, Lib1A_R2 e Lib1A_R3. Os oligonucleotídeos para a geração da biblioteca 1B são os mesmos exceto em que os oligonucleotídeos Lib1B_F2 substitui Lib1A_F2 e Lib1B_R1 substitui Lib1A_R1. Os oligonucleotídeos para a geração de Lib1C, os oligos são os mesmos de novo exceto o oligo Lib1C_F2 que substitui Lib1A_F2 e oligo Lib1C_R1 que substitui Lib1A_R1. Os oligonucleotídeos para a geração da biblioteca 2A são Lib1A_F1, Lib2A_F2, Lib2A_F3, Lib2A_R1, Lib2A_R2 e Lib1A_R3. Os oligonucleotídeos para a geração da biblioteca 2B, os oligonucleotídeos usados são os mesmos que para a biblioteca 2a exceto que o oligo Lib2B_F3 substitui Lib2A_F3 e o oligonucleotídeo Lib2B_R2 substitui o oligo Lib2A_R2.

Para cada biblioteca, 6 longos oligonucleotídeos primers, a uma concentração de 20 nM, foram misturados com dois primers de oligonucleotídeo de extremidade curta (compreendendo campos de restrição para Bci-I (primer dianteiro) e Sac-II (primer reverso)) a uma concentração de 1 μ M. As reações de PCR foram ajustadas usando polimerase Invitrogen's supermix (Carlsbad, CA) empregando as condições a seguir: (a) uma fusão inicial a 94°C por 1 minuto e (b) 30 ciclos a 94°C por 1 minuto, 50°C por 2 minutos, e 72°C por 3 minutos.

Tabela 3

Primers oligonucleotídeos para a geração de bibliotecas de anticorpo 1A, 1B, 1C, 2A, e 2B

Nome do Oligo	SEQ ID NO:	Seqüência
---------------	------------	-----------

Bci-I dianteira	28	ttcttctgatcaggagcccaaat
Sac-II reversa	29	GCTCCTCCCGCGGCTTTGTCTTGG
Lib1A_F1	30	Ttcttctgatcaggagcccaaatcttctgacaaaactcacacatctc caccgtgccag
Lib1A_F2	31	Gggaccgtcagttcttcttcccccaaaaccaaggacaccctc atgatctccgga
Lib1A_F3	32	Tgtggtggacgtgagccacgaagaccctgaggtcaagttcaactg gtacgtggacggcg
Lib1A_R1	33	AGAGGAAGACTGACGGTCCACCNWNCAAGAG TTCAGGTGCTGGGCACGGTGGAGATGTGT
Lib1A_R2	34	CGTGGCTCACGTCCACCACCACGCATGTGAC CTCAGGGGTCCGGGAGATCATGAGGGTGT
Lib1A_R3	35	GCTCCTCCCGCGGCTTTGTCTTGGCATTATGC ACCTCCACGCCGTCCACGTACCAGTTGA
Lib1B_F2	36	Wggaccgtcagttcttcttcccccaaaaccaaggacaccct catgatctccgga
Lib1B_R1	37	AGAGGAAGACTGACGGTCCNWNACCCAAGAG TTCAGGTGCTGGGCACGGTGGAGATGTGT
Lib1C_F2	38	Gnwnccgtcagttcttcttcccccaaaaccaaggacacc tcatgatctccgga
Lib1C_R1	39	AGAGGAAGACTGACGGNWNNTCCACCCAAGA GTTTCAGGTGCTGGGCACGGTGGAGATGTGT
Lib2A_F2	40	Gccgtcagttcttcttcccccaaaaccaaggacaccctcat gatctcccgagccc
Lib2A_F3	41	Tgtggacgtgnwnagccacgaagaccctgaggtcaagttcaac tggtacgtggacggcg
Lib2A_R1	42	GGAAGAGGAAGACTGACGGTCCACCCAAGA GTTTCAGGTGCTGGGCACGGTGGAGATGTGT
Lib2A_R2	43	CGTGGCTNWNACGTCCACCACCACGCATG TGACCTCAGGGGTCCGGGAGATCATGAGG
Lib2B_F3	44	Tgtggacgtgagcnwnacgaagaccctgaggtcaagttcaac tggtacgtggacggcg
Lib2B_R2	45	CGTGNWNGCTCACGTCCACCACCACGCATG TGACCTCAGGGGTCCGGGAGATCATGAGGG

Os fragmentos amplificados foram ligados em vetor TOPO Invitrogen e transformados em células bacterianas TOP10. Um excesso de 200 colônias foi agrupado e a complexidade de cada biblioteca foi determinada por análise de seqüência de 15 clones. Os fragmentos foram então digeridos com Bci-I e Sac-II e ligados em um vetor de expressão pD18 digerido com Bci-I/Sac-II codificando um produto imunofarmacêutico modular pequeno anti-CD20 (produto SMIP™) e trabalhado por engenharia para remover um campo de restrição extra Sac-II assim como trabalhado por engenharia para interromper o códon e um único campo de restrição (Not-I) para permitir a linearização do vetor de retorno contendo o domínio CH2 do tipo selvagem.

Os genes para as bibliotecas 3A, 3B e 3C foram construídos usando um método Quickchange da Stratagene (La Jolla, CA). 33 primers de oligonucleotídeos de sentido e anti-sentido de par de base foram projetados para facilitar a incorporação das seqüências de nucleotídeos codificando a seqüência de amino ácido NWN (isto é, asparagina-triptofano-asparagina). As seqüências dos referidos primers de oligonucleotídeo são apresentadas na tabela 4. Os oligonucleotídeos para a biblioteca 3A são Lib3A-F e Lib3A-R. Oligonucleotídeos para a biblioteca 3B são Lib3B-F e Lib3B-R. Oligonucleotídeos para a biblioteca 3C são Lib3C-F e Lib3C-R.

Tabela 4

Primers de oligonucleotídeo para a geração de bibliotecas de anticorpos 3A, 3B e 3C

Nome do oligo	SEQ ID NO:	Seqüência
lib3A-F	46	gtctccaacaaagccnwnctcccagccccatc
lib3A-R	47	GATGGGGGCTGGGAGNWNNGGCTTTGTTGGAGAC
Lib3B-F	48	cccaacaaagccctcnwnccagccccatcgag
Lib3B-R	49	CTCGATGGGGGCTGGNWNAGGGCTTTGTTGGAG
Lib3C-F	50	cacaaagccctccanwnngccccatcgagaaaac
Lib3C-R	51	GTTTTCTCGATGGGGGCNWNTGGGAGGGCTTTGTTG

Para cada biblioteca, uma reação de PCR de 100 µL continha 20 ng de modelo de DNA (isto é, um vetor de expressão que codifica um produto imunofarmacêutico modular específico para CD37 (produto SMIP™), 125 ng de cada dos primers de oligonucleotídeo dianteiro e reverso, 500 nM de dNTP, e 2,5 unidades de DNA Ultra Pfu da Stratagene. As condições a seguir foram empregadas para a reação de PCR: (a) fusão inicial a 95°C por 1

minuto e (b) 18 ciclos de 95°C por 1 minuto, 60°C por 1 minuto, e 68°C por 6.5 minutos. Em seguida de cada reação de PCR, o vetor do tipo selvagem foi digerido com incubação com a enzima de restrição Dpn-I por 2 horas. A mistura de DNA foi então transformada em células bacterianas TOP10. Um excesso de 200 colônias de cada biblioteca foi agrupado e a complexidade de cada biblioteca foi determinada por análise de sequência de 15 clones. As bibliotecas foram digeridas com Sac-II e endonucleases de restrição Bsr-G1 e ligados em pD18 com uma extremidade dianteira anti-CD37, um campo extra Sac-II, um códon de parada, e um campo de restrição Not1 para linearizar o vetor de fundo contendo a sequência CH2 de tipo selvagem. Figura 3

Clones membro de cada biblioteca foram expressos em células COS em placas de 96 cavidades ou 24 cavidades. A ligação dos clones a CD16 pode ser testada ao se empregar CD16 biotinilado com um prolongamento de imunoglobulina (Hulg) humano ou (Mulg) de murino e varrendo proteínas candidatas individuais por metodologia de ELISA padrão onde as placas são revestidas com proteína A e os sobrenadantes contendo os candidatos individuais são adicionados seguidos por CD16 Hulg-Biotin e streptavidin-HRP. As moléculas dotadas de uma maior afinidade de ligação específica para CD16 em comparação ao produto SMIP™ do tipo selvagem correspondente podem então ser selecionadas para a caracterização adicional em um teste ADCC e para a interação com a proteína A.

Exemplo 2

Modificação de alças dentro de um domínio CH3 de imunoglobulina IgG confere especificidades de ligação únicas

O referido exemplo descreve as modificações exemplificativas dentro da região CH3 IgG que proporciona novas superfícies de reconhecimento não nativas, e conseqüentemente, especificidades de ligação.

As diversas alças dentro do domínio CH3 do IgG foram trabalhadas por engenharia para proporcionar interações de ligação IgA-específicas (referidas aqui como larvas IgG/A). A expressão dos três construtores de larva IgG/A a seguir foram realizadas e expressas em células Cos; (a) amino ácidos IgG dentro dos domínios CH3 IgG foram substituídos com amino ácidos do domínio CH3 IgA, cujos amino ácidos na imunoglobulina IgA do tipo selvagem entra em contato direto com o Fc α -receptor (*isto é*, CD89), assim como dois amino ácidos adicionais dentro da alça CD; (b) amino ácidos IgG dentro da alça do domínio FG CH3 IgG foram substituídas com amino ácidos do domínio de alça FG CH3 IgA assim como outros amino ácidos que entram em contato com o Fc α -receptor; e (c) os amino ácidos IgG dentro do domínio de alça CD CH3 IgG foram substituídos com os amino ácidos do domínio de alça CD CH3 assim como outros amino ácidos que entram em contato com o Fc α -receptor. Em todos os casos, a extremidade dianteira de cada um dos produtos CMIP™

IgG mutante resultante foi humanizado 2H7-018014.

A especificidade e/ou afinidade de ligação de um campo de ligação de Fc γ -receptor foi modificado ao se mudar os resíduos de amino ácido nas alças CD e FG de CH3. A figura 1 mostra o alinhamento de seqüência dos domínios CH2 e/ou CH3 IgG e IgA. As estruturas terciárias de IgG e IgA são relativamente similares como indicado pelo desvio RMS de 1,7 Å quando as estruturas são superpostas.

Os três genes foram construídos usando uma metodologia de extensão de PCR de sobreposição. Para cada versão, um conjunto de 4 oligonucleotídeos longos a uma concentração de 20 nM foram misturados com os dois oligonucleotídeos de extremidade curta (curta F e curta R) a uma concentração de 1 μ M. As reações de PCR foram ajustadas usando polimerase Invitrogen's supermix empregando as condições a seguir: (1) uma fusão inicial a 94°C por 1 minuto e (2) 30 ciclos do a seguir: a 94°C por 1 minuto, 50°C por 2 minutos, e 72°C por 3 minutos. Os fragmentos amplificados foram digeridos com Bsr-G1 e Xba-I e inseridos no vetor pD18 que porta o produto SMIP™ anti-CD20 humanizado (018014) digerido com Bsr-G1 e Xba-I para remover o domínio CH3 do tipo selvagem. As seqüências para os oligonucleotídeos são apresentadas na tabela 5.

Tabela 5

Primers de oligonucleotídeo para modificação de alças dentro de um domínio CH3 de imunoglobulina IgG

Nome oligo	SEQ ID NO:	Seqüência
F1_ver1	52	cagaaccacaggtgtacaccctgccccatcccggtgatgagctgaccaagaaccagg
F2_ver1	53	agcttctatccaagcgacatcgccgtgcgtgggagagcaatgggcaggagctgccg
F3_ver1	54	ccccgtgctggactccgacggctccttctctctacagcaagctaccgtggacaa
F4_ver1	55	gcttctctgcatggtgatgcatgaggctctgccactcgcttcacgcagaagagcc
R1_ver1	56	tgcttgatagaagccttgaccaggcaggtcaggctgacctggttcttggtcagct
R2_ver1	57	cgagtcagcacgggagggcgtggtctgtagttgttctccggcagctcctgccatt
R3_ver1	58	cccatgcaggagaagacgttcccctgctgccacctgcttgtccacggtgagcttg
R4_ver1	59	cgctataatctagatcatttaccggagacagggagaggctcttctgcgtgaagg
short-F	60	cagaaccacaggtgtacaccctgccc
short-R	61	cctataatctagatcatttacc
F4_ver2	62	gtcttctctgcatggtggggccacgaggccctgccgctggccttcacacagaagacca
R4_ver2	63	cgctataatctagatcatttaccggccaagcggtcgatggttcttctgtgtaagg
F2_ver3	64	aggcttctatccaagcgacatcgccgttcgtggctgcaggggtcacaggagctgcc
R2_ver3	65	cgagtcagcacgggagggcgtggtctgtacttctcgggggcagctcctgtgacct

A substituição dos amino ácidos MI por LL próximos do início da região CH2 foi realizada por mutagêneses de PCR/ os referidos dois amino ácidos são pontos de contato adicionais entre as imunoglobulinas do isótipo IgA e seus receptores cognatos Fc CD89 (FcαR). Ver figura 2. As seqüências de cada um dos três produtos SMIP™ com base em IgG modificado foram confirmados e os vetores pD18 correspondentes foram transfectados em células COS para a expressão de gene. Os sobrenadantes foram examinados quanto à atividade de ligação para CD20 por coloração de células Wil2S e análise de citometria de fluxo. A coloração de CD20 com SMIP CH3 2H7 mutado para a ligação ao receptor IgA.

Os sobrenadantes foram primeiro incubados com células Wil2S por 30 minutos em gelo. As células foram lavadas duas vezes e uma diluição de 1:100 do IgG anti-humano PE conjugado foi adicionado. As células foram lavadas mais uma vez e MF para cada amostra foi determinada na citometria de fluxo. Cada uma das três imunoglobulinas modificadas foi expressa a um nível de aproximadamente 2 µg/mL a 4 µg/mL quando comparado à curva padrão.

Para testar a ligação das referidas moléculas ao receptor IgA, células Wil2S foram incubadas com os sobrenadantes por 30 minutos, lavadas duas vezes com 1% BSA / PBS, e 5 µg/mL de CD89 (receptor IgA) humano Ig em PBS foi adicionado e incubado por outros 30 minutos. As células foram lavadas mais uma vez e 50 µL de proteína A PE conjugada diluída 1:100 em 1% de BSA/PBS foram adicionadas e incubadas por 30 minutos. As amostras foram lavadas com 1% de BSA/PBS e resuspensas em 100 mL do tampão de lavagem. As amostras foram então lidas por citometria de fluxo.

Cada uma das três imunoglobulinas modificadas foi expressa a um nível de aproximadamente 2 µg/mL – 4 µg/mL, purificada usando cromatografia de afinidade de proteína A, e caracterizada por ligação específica a células Wil2S e a CD89 por metodologias de citometria de fluxo convencionais empregando CD89 Hulg e proteína A PE-marcada.

LISTAGEM DE SEQUÊNCIA

<110> TRUBION PHARMACEUTICALS INC.

<120> "PROTEÍNAS DE LIGAÇÃO COMPREENDENDO ARTICULAÇÃO DE
IMUNOGLOBULINA E REGIÕES FC DOTADAS DE FUNÇÕES EFETORAS FC
ALTERADAS"

<130> 20632/2203607-WO0

<140>

<141>

<150> 60/744,899

<151> 2006-04-14

<160> 106

<170> PatentIn version 3.3

<210> 1

<211> 19

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 1

Val Pro Ser Thr Pro Pro Thr Pro Ser Pro Ser Thr Pro Pro Thr Pro

1 5 10 15

Ser Pro Ser

<210> 2

<211> 101

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 2

Cys Cys His Pro Arg Leu Ser Leu His Arg Pro Ala Leu Glu Asp Leu

1 5 10 15

Leu Leu Gly Ser Glu Ala Asn Leu Thr Cys Thr Leu Thr Gly Leu Arg

20 25 30

Asp Ala Ser Gly Val Thr Phe Thr Trp Thr Pro Ser Ser Gly Lys Ser

35 40 45

Ala Val Gln Gly Pro Pro Glu Arg Asp Leu Cys Gly Cys Tyr Ser Val

50 55 60

Ser Ser Val Leu Pro Gly Cys Ala Glu Pro Trp Asn His Gly Lys Thr

65 70 75 80

Phe Thr Cys Thr Ala Ala Tyr Pro Glu Ser Lys Thr Pro Leu Thr Ala

85 90 95

Thr Leu Ser Lys Ser

100

<210> 3

<211> 131

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 3

Gly Asn Thr Phe Arg Pro Glu Val His Leu Leu Pro Pro Pro Ser Glu

1 5 10 15

Glu Leu Ala Leu Asn Glu Leu Val Thr Leu Thr Cys Leu Ala Arg Gly

20 25 30

Phe Ser Pro Lys Asp Val Leu Val Arg Trp Leu Gln Gly Ser Gln Glu

35 40 45

Leu Pro Arg Glu Lys Tyr Leu Thr Trp Ala Ser Arg Gln Glu Pro Ser
 50 55 60

Gln Gly Thr Thr Thr Phe Ala Val Thr Ser Ile Leu Arg Val Ala Ala
 65 70 75 80

Glu Asp Trp Lys Lys Gly Asp Thr Phe Ser Cys Met Val Gly His Glu
 85 90 95

Ala Leu Pro Leu Ala Phe Thr Gln Lys Thr Ile Asp Arg Leu Ala Gly
 100 105 110

Lys Pro Thr His Val Asn Val Ser Val Val Met Ala Glu Val Asp Gly
 115 120 125

Thr Cys Tyr
 130

<210> 4

<211> 6

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 4

Val Pro Pro Pro Pro Pro
 1 5

<210> 5

<211> 101

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 5

Cys Cys His Pro Arg Leu Ser Leu His Arg Pro Ala Leu Glu Asp Leu
 1 5 10 15

Leu Leu Gly Ser Glu Ala Asn Leu Thr Cys Thr Leu Thr Gly Leu Arg

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

<210> 6

<211> 131

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 6

Gly Asn Thr Phe Arg Pro Glu Val His Leu Leu Pro Pro Pro Ser Glu
 1 5 10 15

Glu Leu Ala Leu Asn Glu Leu Val Thr Leu Thr Cys Leu Ala Arg Gly
 20 25 30

Phe Ser Pro Lys Asp Val Leu Val Arg Trp Leu Gln Gly Ser Gln Glu
 35 40 45

Leu Pro Arg Glu Lys Tyr Leu Thr Trp Ala Ser Arg Gln Glu Pro Ser
 50 55 60

Gln Gly Thr Thr Thr Phe Ala Val Thr Ser Ile Leu Arg Val Ala Ala
 65 70 75 80

Glu Asp Trp Lys Lys Gly Asp Thr Phe Ser Cys Met Val Gly His Glu

85

90

95

Ala Leu Pro Leu Ala Phe Thr Gln Lys Thr Ile Asp Arg Leu Ala Gly

100

105

110

Lys Pro Thr His Val Asn Val Ser Val Val Met Ala Glu Val Asp Gly

115

120

125

Thr Cys Tyr

130

<210> 7

<211> 58

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 7

Glu Ser Pro Lys Ala Gln Ala Ser Ser Val Pro Thr Ala Gln Pro Gln

1

5

10

15

Ala Glu Gly Ser Leu Ala Lys Ala Thr Thr Ala Pro Ala Thr Thr Arg

20

25

30

Asn Thr Gly Arg Gly Gly Glu Glu Lys Lys Lys Glu Lys Glu Lys Glu

35

40

45

Glu Gln Glu Glu Arg Glu Thr Lys Thr Pro

50

55

<210> 8

<211> 108

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 8

Glu Cys Pro Ser His Thr Gln Pro Leu Gly Val Tyr Leu Leu Thr Pro
 1 5 10 15

Ala Val Gln Asp Leu Trp Leu Arg Asp Lys Ala Thr Phe Thr Cys Phe
 20 25 30

Val Val Gly Ser Asp Leu Lys Asp Ala His Leu Thr Trp Glu Val Ala
 35 40 45

Gly Lys Val Pro Thr Gly Gly Val Glu Glu Gly Leu Leu Glu Arg His
 50 55 60

Ser Asn Gly Ser Gln Ser Gln His Ser Arg Leu Thr Leu Pro Arg Ser
 65 70 75 80

Leu Trp Asn Ala Gly Thr Ser Val Thr Cys Thr Leu Asn His Pro Ser
 85 90 95

Leu Pro Pro Gln Arg Leu Met Ala Leu Arg Glu Pro
 100 105

<210> 9

<211> 117

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 9

Ala Ala Gln Ala Pro Val Lys Leu Ser Leu Asn Leu Leu Ala Ser Ser
 1 5 10 15

Asp Pro Pro Glu Ala Ala Ser Trp Leu Leu Cys Glu Val Ser Gly Phe
 20 25 30

Ser Pro Pro Asn Ile Leu Leu Met Trp Leu Glu Asp Gln Arg Glu Val
 35 40 45

Asn Thr Ser Gly Phe Ala Pro Ala Arg Pro Pro Pro Gln Pro Arg Ser
 50 55 60

Thr Thr Phe Trp Ala Trp Ser Val Leu Arg Val Pro Ala Pro Pro Ser
 65 70 75 80

Pro Gln Pro Ala Thr Tyr Thr Cys Val Val Ser His Glu Asp Ser Arg
 85 90 95

Thr Leu Leu Asn Ala Ser Arg Ser Leu Glu Val Ser Tyr Val Thr Asp
 100 105 110

His Gly Pro Met Lys
 115

<210> 10

<211> 107

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 10

Val Cys Ser Arg Asp Phe Thr Pro Pro Thr Val Lys Ile Leu Gln Ser
 1 5 10 15

Ser Cys Asp Gly Gly Gly His Phe Pro Pro Thr Ile Gln Leu Leu Cys
 20 25 30

Leu Val Ser Gly Tyr Thr Pro Gly Thr Ile Asn Ile Thr Trp Leu Glu
 35 40 45

Asp Gly Gln Val Met Asp Val Asp Leu Ser Thr Ala Ser Thr Thr Gln
 50 55 60

Glu Gly Glu Leu Ala Ser Thr Gln Ser Glu Leu Thr Leu Ser Gln Lys
 65 70 75 80

His Trp Leu Ser Asp Arg Thr Tyr Thr Cys Gln Val Thr Tyr Gln Gly

85 90 95

His Thr Phe Glu Asp Ser Thr Lys Lys Cys Ala

100 105

<210> 11

<211> 108

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 11

Asp Ser Asn Pro Arg Gly Val Ser Ala Tyr Leu Ser Arg Pro Ser Pro

1 5 10 15

Phe Asp Leu Phe Ile Arg Lys Ser Pro Thr Ile Thr Cys Leu Val Val

20 25 30

Asp Leu Ala Pro Ser Lys Gly Thr Val Asn Leu Thr Trp Ser Arg Ala

35 40 45

Ser Gly Lys Pro Val Asn His Ser Thr Arg Lys Glu Glu Lys Gln Arg

50 55 60

Asn Gly Thr Leu Thr Val Thr Ser Thr Leu Pro Val Gly Thr Arg Asp

65 70 75 80

Trp Ile Glu Gly Glu Thr Tyr Gln Cys Arg Val Thr His Pro His Leu

85 90 95

Pro Arg Ala Leu Met Arg Ser Thr Thr Lys Thr Ser

100 105

<210> 12

<211> 110

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 12

Gly Pro Arg Ala Ala Pro Glu Val Tyr Ala Phe Ala Thr Pro Glu Trp

1 5 10 15

Pro Gly Ser Arg Asp Lys Arg Thr Leu Ala Cys Leu Ile Gln Asn Phe

20 25 30

Met Pro Glu Asp Ile Ser Val Gln Trp Leu His Asn Glu Val Gln Leu

35 40 45

Pro Asp Ala Arg His Ser Thr Thr Gln Pro Arg Lys Thr Lys Gly Ser

50 55 60

Gly Phe Phe Val Phe Ser Arg Leu Glu Val Thr Arg Ala Glu Trp Glu

65 70 75 80

Gln Lys Asp Glu Phe Ile Cys Arg Ala Val His Glu Ala Ala Ser Pro

85 90 95

Ser Gln Thr Val Gln Arg Ala Val Ser Val Asn Pro Gly Lys

100 105 110

<210> 13

<211> 15

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 13

Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro

1 5 10 15

<210> 14

<211> 110

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 14

Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys
 1 5 10 15

Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val
 20 25 30

Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr
 35 40 45

Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu
 50 55 60

Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His
 65 70 75 80

Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys
 85 90 95

Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys
 100 105 110

<210> 15

<211> 107

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 15

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

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

Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu
 35 40 45

Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe

50 55 60

Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly

65 70 75 80

Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr

85 90 95

Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys

100 105

<210> 16

<211> 12

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 16

Glu Arg Lys Cys Cys Val Glu Cys Pro Pro Cys Pro

1 5 10

<210> 17

<211> 109

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 17

Ala Pro Pro Val Ala Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro

1 5 10 15

Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val

20 25 30

Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val

35 40 45

Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln

50 55 60

Phe Asn Ser Thr Phe Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Val His Gln
65 70 75 80

Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly
 85 90 95

Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Thr Lys
 100 105

<210> 18

<211> 107

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 18

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

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

Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu
 35 40 45

Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Met Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe
 50 55 60

Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly
65 70 75 80

Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr
 85 90 95

Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 100 105

<210> 19

<211> 62

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 19

Glu Leu Lys Thr Pro Leu Gly Asp Thr Thr His Thr Cys Pro Arg Cys

1 5 10 15

Pro Glu Pro Lys Ser Cys Asp Thr Pro Pro Pro Cys Pro Arg Cys Pro

20 25 30

Glu Pro Lys Ser Cys Asp Thr Pro Pro Pro Cys Pro Arg Cys Pro Glu

35 40 45

Pro Lys Ser Cys Asp Thr Pro Pro Pro Cys Pro Arg Cys Pro

50 55 60

<210> 20

<211> 110

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 20

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

1 5 10 15

Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val

20 25 30

Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Lys Trp Tyr

35 40 45

Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu

50 55 60

Gln Tyr Asn Ser Thr Phe Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His
 65 70 75 80

Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys
 85 90 95

Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Thr Lys
 100 105 110

<210> 21

<211> 107

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 21

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

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

Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Ser Gly Gln Pro Glu
 35 40 45

Asn Asn Tyr Asn Thr Thr Pro Pro Met Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe
 50 55 60

Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly
 65 70 75 80

Asn Ile Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn Arg Phe
 85 90 95

Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 100 105

<210> 22

<211> 12

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 22

Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Ser Cys Pro

1 5 10

<210> 23

<211> 110

<212> PRT

<213> Seqüência Artificial

<220>

<223> Descrição artificial de seqüência: Peptídeo sintético

<400> 23

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

1 5 10 15

Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val

20 25 30

Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr

35 40 45

Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu

50 55 60

Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His

65 70 75 80

Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys

85 90 95

Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys

100 105 110

<210> 24

<211> 107

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 24

Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu

1 5 10 15

Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe

20 25 30

Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu

35 40 45

Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe

50 55 60

Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly

65 70 75 80

Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr

85 90 95

Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys

100 105

<210> 25

<211> 112

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 25

Val Ile Ala Glu Leu Pro Pro Lys Val Ser Val Phe Val Pro Pro Arg

1 5 10 15

Asp Gly Phe Phe Gly Asn Pro Arg Lys Ser Lys Leu Ile Cys Gln Ala

20 25 30

Thr Gly Phe Ser Pro Arg Gln Ile Gln Val Ser Trp Leu Arg Glu Gly

35 40 45

Lys Gln Val Gly Ser Gly Val Thr Thr Asp Gln Val Gln Ala Glu Ala

50 55 60

Lys Glu Ser Gly Pro Thr Thr Tyr Lys Val Thr Ser Thr Leu Thr Ile

65 70 75 80

Lys Glu Ser Asp Trp Leu Gly Gln Ser Met Phe Thr Cys Arg Val Asp

85 90 95

His Arg Gly Leu Thr Phe Gln Gln Asn Ala Ser Ser Met Cys Val Pro

100 105 110

<210> 26

<211> 106

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 26

Asp Gln Asp Thr Ala Ile Arg Val Phe Ala Ile Pro Pro Ser Phe Ala

1 5 10 15

Ser Ile Phe Leu Thr Lys Ser Thr Lys Leu Thr Cys Leu Val Thr Asp

20 25 30

Leu Thr Thr Tyr Asp Ser Val Thr Ile Ser Trp Thr Arg Gln Asn Gly

35 40 45

Glu Ala Val Lys Thr His Thr Asn Ile Ser Glu Ser His Pro Asn Ala

50 55 60

Thr Phe Ser Ala Val Gly Glu Ala Ser Ile Cys Glu Asp Asp Trp Asn

65 70 75 80

Ser Gly Glu Arg Phe Thr Cys Thr Val Thr His Thr Asp Leu Pro Ser
 85 90 95

Pro Leu Lys Gln Thr Ile Ser Arg Pro Lys
 100 105

<210> 27

<211> 131

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 27

Gly Val Ala Leu His Arg Pro Asp Val Tyr Leu Leu Pro Pro Ala Arg
 1 5 10 15

Glu Gln Leu Asn Leu Arg Glu Ser Ala Thr Ile Thr Cys Leu Val Thr
 20 25 30

Gly Phe Ser Pro Ala Asp Val Phe Val Gln Trp Met Gln Arg Gly Gln
 35 40 45

Pro Leu Ser Pro Glu Lys Tyr Val Thr Ser Ala Pro Met Pro Glu Pro
 50 55 60

Gln Ala Pro Gly Arg Tyr Phe Ala His Ser Ile Leu Thr Val Ser Glu
 65 70 75 80

Glu Glu Trp Asn Thr Gly Glu Thr Tyr Thr Cys Val Val Ala His Glu
 85 90 95

Ala Leu Pro Asn Arg Val Thr Glu Arg Thr Val Asp Lys Ser Thr Gly
 100 105 110

Lys Pro Thr Leu Tyr Asn Val Ser Leu Val Met Ser Asp Thr Ala Gly
 115 120 125

Thr Cys Tyr

130

<210> 28

<211> 23

<212> DNA

<213> Seqüência Artificial

<220>

<223> Descrição artificial de seqüência: Synthetic
primer

<400> 28

ttcttctgat caggagccca aat

23

<210> 29

<211> 24

<212> DNA

<213> Seqüência Artificial

<220>

<223> Descrição artificial de seqüência: Synthetic
primer

<400> 29

gctcctcccg cggtttgtc ttgg

24

<210> 30

<211> 59

<212> DNA

<213> Seqüência Artificial

<220>

<223> Descrição artificial de seqüência: Synthetic
primer

<400> 30

ttcttctgat caggagccca aatcttctga caaaactcac acatctccac cgtgcccag 59

<210> 31

<211> 59

<212> DNA

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> Descrição artificial de sequência: Synthetic
primer

<400> 31

gggaccgtca gtcttcctct tcccccaaa acccaaggac accctcatga tctcccgga 59

<210> 32

<211> 59

<212> DNA

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> Descrição artificial de sequência: Synthetic
primer

<400> 32

tgtggtggac gtgagccacg aagaccctga ggtcaagttc aactggtacg tggacggcg 59

<210> 33

<211> 60

<212> DNA

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> Descrição artificial de sequência: Synthetic
primer

<220>

<221> modified_base

<222> (23)..(23)

<223> a, c, g, t, unknown or other

<220>

<221> modified_base

<222> (25)..(25)

<223> a, c, g, t, unknown or other

<400> 33

agaggaagac tgacggtcca ccwncaaga gtcaggtgc tgggcacggt ggagatgtgt 60

<210> 34

<211> 60

<212> DNA

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> Descrição artificial de sequência: Synthetic
primer

<400> 34

cgtggctcac gtccaccacc acgcatgtga cctcaggggt ccgggagatc atgaggggtgt 60

<210> 35

<211> 60

<212> DNA

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> Descrição artificial de sequência: Synthetic
primer

<400> 35

gctcctcccg cggctttgtc ttggcattat gcacctccac gccgtccacg taccagttga 60

<210> 36

<211> 59

<212> DNA

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> Descrição artificial de sequência: Synthetic
primer

<400> 36

wggaccgtca gtcttcctct tcccccaaa acccaaggac accctcatga tctcccgga 59

<210> 37

<211> 60

<212> DNA

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> Descrição artificial de sequência: Synthetic
primer

<220>

<221> modified_base

<222> (20)..(20)

<223> a, c, g, t, unknown or other

<220>

<221> modified_base

<222> (22)..(22)

<223> a, c, g, t, unknown or other

<400> 37

agaggaagac tgacggtccn wnaccaaga gttcagggtc tgggcacggt ggagatgtgt 60

<210> 38

<211> 59

<212> DNA

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> Descrição artificial de sequência: Synthetic
primer

<220>

<221> modified_base

<222> (2)..(2)

<223> a, c, g, t, unknown or other

<220>

<221> modified_base

<222> (4)..(4)

<223> a, c, g, t, unknown or other

<400> 38

gnwnccgtca gtcttctct tcccccaaa acccaaggac accctcatga tctccgga 59

<210> 39

<211> 60

<212> DNA

<213> Seqüência Artificial

<220>

<223> Descrição artificial de seqüência: Synthetic
primer

<220>

<221> modified_base

<222> (17)..(17)

<223> a, c, g, t, unknown or other

<220>

<221> modified_base

<222> (19)..(19)

<223> a, c, g, t, unknown or other

<400> 39

agaggaagac tgacggnwnt ccaccaaga gtcagggtgc tgggcacggt ggagatgtgt 60

<210> 40

<211> 59

<212> DNA

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> Descrição artificial de sequência: Synthetic
primer

<400> 40

gccgtcagtc ttctcttcc ccccaaaacc caaggacacc ctcatgatct cccggaccc 59

<210> 41

<211> 59

<212> DNA

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> Descrição artificial de sequência: Synthetic
primer

<220>

<221> modified_base

<222> (11)..(11)

<223> a, c, g, t, unknown or other

<220>

<221> modified_base

<222> (13)..(13)

<223> a, c, g, t, unknown or other

<400> 41

tgtggacgtg nwnagccacg aagaccctga ggtcaagttc aactggtacg tggacggcg 59

<210> 42

<211> 60

<212> DNA

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> Descrição artificial de seqüência: Synthetic
primer

<400> 42

ggaagaggaa gactgacggt ccaccaaga gtcagggtgc tgggcacggt ggagatgtgt 60

<210> 43

<211> 59

<212> DNA

<213> Seqüência Artificial

<220>

<223> Descrição artificial de seqüência: Synthetic
primer

<220>

<221> modified_base

<222> (8)..(8)

<223> a, c, g, t, unknown or other

<220>

<221> modified_base

<222> (10)..(10)

<223> a, c, g, t, unknown or other

<400> 43

cgtggctnwn cacgtccacc accacgcatg tgacctcagg ggtccgggag atcatgagg 59

<210> 44

<211> 59

<212> DNA

<213> Seqüência Artificial

<220>

<223> Descrição artificial de seqüência: Synthetic
primer

<220>

<221> modified_base

<222> (14)..(14)

<223> a, c, g, t, unknown or other

<220>

<221> modified_base

<222> (16)..(16)

<223> a, c, g, t, unknown or other

<400> 44

tgtggacgtg agcnwncacg aagaccctga ggtcaagttc aactgggtacg tggacggcg 59

<210> 45

<211> 60

<212> DNA

<213> Seqüência Artificial

<220>

<223> Descrição artificial de seqüência: Synthetic
primer

<220>

<221> modified_base

<222> (5)..(5)

<223> a, c, g, t, unknown or other

<220>

<221> modified_base

<222> (7)..(7)

<223> a, c, g, t, unknown or other

<400> 45

cgtnwnngct cacgtccacc accacgcatg tgacctcagg ggtccgggag atcatgaggg 60

<210> 46

<211> 33

<212> DNA

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> Descrição artificial de sequência: Synthetic
primer

<220>

<221> modified_base

<222> (16)..(16)

<223> a, c, g, t, unknown or other

<220>

<221> modified_base

<222> (18)..(18)

<223> a, c, g, t, unknown or other

<400> 46

gtctccaaca aagccnwnct cccagccccc atc

33

<210> 47

<211> 33

<212> DNA

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> Descrição artificial de sequência: Synthetic
primer

<220>

<221> modified_base

<222> (16)..(16)

<223> a, c, g, t, unknown or other

<220>

<221> modified_base

<222> (18)..(18)

<223> a, c, g, t, unknown or other

<400> 47

gatgggggct gggagnwngg cttgttgga gac

33

<210> 48

<211> 33

<212> DNA

<213> Seqüência Artificial

<220>

<223> Descrição artificial de seqüência: Synthetic
primer

<220>

<221> modified_base

<222> (16)..(16)

<223> a, c, g, t, unknown or other

<220>

<221> modified_base

<222> (18)..(18)

<223> a, c, g, t, unknown or other

<400> 48

cccaacaaag ccctcnwncc agcccccatc gag

33

<210> 49

<211> 34

<212> DNA

<213> Seqüência Artificial

<220>

<223> Descrição artificial de seqüência: Synthetic
primer

<220>

<221> modified_base

<222> (16)..(16)

<223> a, c, g, t, unknown or other

<220>

<221> modified_base

<222> (18)..(18)

<223> a, c, g, t, unknown or other

<400> 49

ctcgatgggg gctggnwnga gggctttgtt ggag

34

<210> 50

<211> 35

<212> DNA

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> Descrição artificial de sequência: Synthetic
primer

<220>

<221> modified_base

<222> (16)..(16)

<223> a, c, g, t, unknown or other

<220>

<221> modified_base

<222> (18)..(18)

<223> a, c, g, t, unknown or other

<400> 50

cacaaagccc tccanwngc ccccatcgag aaaac

35

<210> 51

<211> 36

<212> DNA

<213> Seqüência Artificial

<220>

<223> Descrição artificial de seqüência: Synthetic
primer

<220>

<221> modified_base

<222> (18)..(18)

<223> a, c, g, t, unknown or other

<220>

<221> modified_base

<222> (20)..(20)

<223> a, c, g, t, unknown or other

<400> 51

gttttctcga tgggggcnwn tgggagggt ttgtg

36

<210> 52

<211> 57

<212> DNA

<213> Seqüência Artificial

<220>

<223> Descrição artificial de seqüência: Synthetic
primer

<400> 52

cagaaccaca ggtgtacacc ctgcccccat cccgggatga gctgaccaag aaccagg

57

<210> 53

<211> 57

<212> DNA

<213> Seqüência Artificial

<220>

<223> Descrição artificial de sequência: Synthetic
primer

<400> 53

agcttctatc caagcgacat cgccgtgcgt tgggagagca atgggcagga gctgccg 57

<210> 54

<211> 57

<212> DNA

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> Descrição artificial de sequência: Synthetic
primer

<400> 54

ccccgtgctg gactccgacg gctccttctt cctctacagc aagctcaccg tggacaa 57

<210> 55

<211> 57

<212> DNA

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> Descrição artificial de sequência: Synthetic
primer

<400> 55

gcttctcctg catggtgatg catgaggctc tgccactcgc cttcacgcag aagagcc 57

<210> 56

<211> 57

<212> DNA

<213> Sequência Artificial

<220>

primer

<400> 59

cgctataatc tagatcattt acccgagac agggagaggc tctctgcgt gaagg 55

<210> 60

<211> 26

<212> DNA

<213> Seqüênica Artificial

<220>

<223> Descrição artificial de seqüência: Synthetic

primer

<400> 60

cagaaccaca ggtgtacacc ctgccc 26

<210> 61

<211> 22

<212> DNA

<213> Seqüênica Artificial

<220>

<223> Descrição artificial de seqüência: Synthetic

primer

<400> 61

cctataatct agatcattta cc 22

<210> 62

<211> 58

<212> DNA

<213> Seqüência Artificial

<220>

<223> Descrição artificial de seqüência: Synthetic

primer

<223> Descrição artificial de seqüência: Synthetic
primer

<400> 56

tgcttgata gaagccttg accaggcagg tcaggctgac ctggtcttg gtcagct 57

<210> 57

<211> 57

<212> DNA

<213> Seqüência Artificial

<220>

<223> Descrição artificial de seqüência: Synthetic
primer

<400> 57

cgagtccagc acgggaggcg tggctctgta gttgtctcc ggcagctcct gccatt 57

<210> 58

<211> 57

<212> DNA

<213> Seqüência Artificial

<220>

<223> Descrição artificial de seqüência: Synthetic
primer

<400> 58

cccatgcagg agaagacgtt ccctgctgc cacctgctct tgtccacggt gagcttg 57

<210> 59

<211> 55

<212> DNA

<213> Seqüência Artificial

<220>

<223> Descrição artificial de seqüência: Synthetic

<400> 62

gtctctcct gcatggtggg ccacgaggcc ctgccgtgg ccttcacaca gaagacca 58

<210> 63

<211> 55

<212> DNA

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> Descrição artificial de sequência: Synthetic
primer

<400> 63

cgctataatc tagatcattt acccgccaag cggtcgatgg tctctgtgt gaagg 55

<210> 64

<211> 58

<212> DNA

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> Descrição artificial de sequência: Synthetic
primer

<400> 64

aggcttctat ccaagcgaca tcgccgttcg ctggctgcag gggtcacagg agctgccc 58

<210> 65

<211> 57

<212> DNA

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> Descrição artificial de sequência: Synthetic
primer

<400> 65

cgagtccagc acgggaggcg tggctctgta cttctcgcg ggcagctcct gtagacc 57

<210> 66

<211> 223

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 66

Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val

1 5 10 15

Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr

20 25 30

Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Gln

35 40 45

Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Gln Val His Asn Ala Lys

50 55 60

Thr Lys Pro Arg Glu Gln Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser

65 70 75 80

Val Leu Thr Val Leu His Gln Asn Trp Leu Asp Gly Lys Glu Tyr Lys

85 90 95

Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile

100 105 110

Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro

115 120 125

Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu

130 135 140

Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn

145 150 155 160

Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser

165 170 175

Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg

180 185 190

Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu

195 200 205

His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys

210 215 220

<210> 67

<211> 214

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 67

Ala Cys His Pro Arg Leu Ser Leu His Arg Pro Ala Leu Glu Asp Leu

1 5 10 15

Leu Leu Gly Ser Glu Ala Asn Leu Thr Cys Thr Leu Thr Gly Leu Arg

20 25 30

Asp Ala Ser Gly Val Thr Phe Thr Trp Thr Pro Ser Ser Gly Lys Ser

35 40 45

Ala Val Gln Gly Pro Pro Glu Arg Asp Leu Cys Gly Cys Tyr Ser Val

50 55 60

Ser Ser Val Leu Pro Gly Cys Ala Glu Pro Trp Asn His Gly Lys Thr

65 70 75 80

Phe Thr Cys Thr Ala Ala Tyr Pro Glu Ser Lys Thr Pro Leu Thr Ala

85 90 95

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

Pro Pro Pro Ser Glu Glu Leu Ala Leu Asn Glu Leu Val Thr Leu Thr
 115 120 125

Cys Leu Ala Arg Gly Phe Ser Pro Lys Asp Val Leu Val Arg Trp Leu
 130 135 140

Gln Gly Ser Gln Glu Leu Pro Arg Glu Lys Tyr Leu Thr Trp Ala Ser
 145 150 155 160

Arg Gln Glu Pro Ser Gln Gly Thr Thr Thr Phe Ala Val Thr Ser Ile
 165 170 175

Leu Arg Val Ala Ala Glu Asp Trp Lys Lys Gly Asp Thr Phe Ser Cys
 180 185 190

Met Val Gly His Glu Ala Leu Pro Leu Ala Phe Thr Gln Lys Thr Ile
 195 200 205

Asp Arg Leu Ala Gly Lys
 210

<210> 68

<211> 216

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 68

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

Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val
 20 25 30

Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val

35 40 45

Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln

50 55 60

Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln

65 70 75 80

Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala

85 90 95

Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro

100 105 110

Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr

115 120 125

Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser

130 135 140

Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr

145 150 155 160

Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr

165 170 175

Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe

180 185 190

Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys

195 200 205

Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys

210 215

<210> 69

<211> 218

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 69

Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro

1 5 10 15

Lys Asp Thr Leu Leu Leu Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val

20 25 30

Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val

35 40 45

Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln

50 55 60

Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln

65 70 75 80

Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala

85 90 95

Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro

100 105 110

Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr

115 120 125

Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser

130 135 140

Asp Ile Ala Val Arg Trp Glu Ser Asn Gly Gln Glu Leu Pro Glu Asn

145 150 155 160

Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe

165 170 175

Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
 180 185 190

Val Phe Ser Cys Met Val Met His Glu Ala Leu Pro Leu Ala Phe Thr
 195 200 205

Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 210 215

<210> 70

<211> 218

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 70

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

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

Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val
 35 40 45

Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln
 50 55 60

Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln
 65 70 75 80

Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala
 85 90 95

Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro
 100 105 110

Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr
 115 120 125

Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser
 130 135 140

Asp Ile Ala Val Arg Trp Glu Ser Asn Gly Gln Glu Leu Pro Glu Asn
 145 150 155 160

Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
 165 170 175

Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
 180 185 190

Val Phe Ser Cys Met Val Gly His Glu Ala Leu Pro Leu Ala Phe Thr
 195 200 205

Gln Lys Thr Ile Asp Arg Leu Ala Gly Lys
 210 215

<210> 71

<211> 218

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 71

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

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

Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val
 35 40 45

Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln

50 55 60

Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln

65 70 75 80

Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala

85 90 95

Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro

100 105 110

Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr

115 120 125

Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser

130 135 140

Asp Ile Ala Val Arg Trp Leu Gln Gly Ser Gln Glu Leu Pro Arg Glu

145 150 155 160

Lys Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe

165 170 175

Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn

180 185 190

Val Phe Ser Cys Met Val Met His Glu Ala Leu Pro Leu Ala Phe Thr

195 200 205

Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys

210 215

<210> 72

<211> 218

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 72

Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro

1 5 10 15

Lys Asp Thr Leu Leu Leu Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val

20 25 30

Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val

35 40 45

Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln

50 55 60

Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln

65 70 75 80

Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala

85 90 95

Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro

100 105 110

Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr

115 120 125

Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser

130 135 140

Asp Ile Ala Val Arg Trp Glu Ser Asn Gly Gln Glu Leu Pro Glu Asn

145 150 155 160

Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe

165 170 175

Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn

180 185 190

Val Phe Ser Cys Met Val Met His Glu Ala Leu Pro Leu Ala Phe Thr
 195 200 205

Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 210 215

<210> 73

<211> 209

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 73

Cys His Pro Arg Leu Ser Leu His Arg Pro Ala Leu Glu Asp Leu Leu
 1 5 10 15

Leu Gly Ser Glu Ala Asn Leu Thr Cys Thr Leu Thr Gly Leu Arg Asp
 20 25 30

Ala Ser Gly Val Thr Phe Thr Trp Thr Pro Ser Ser Gly Lys Ser Ala
 35 40 45

Val Gln Gly Pro Pro Glu Arg Asp Leu Cys Gly Cys Tyr Ser Val Ser
 50 55 60

Ser Val Leu Pro Gly Cys Ala Glu Pro Trp Asn His Gly Lys Thr Phe
 65 70 75 80

Thr Cys Thr Ala Ala Tyr Pro Glu Ser Lys Thr Pro Leu Thr Ala Thr
 85 90 95

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

Pro Pro Ser Glu Glu Leu Ala Leu Asn Glu Leu Val Thr Leu Thr Cys
 115 120 125

Leu Ala Arg Gly Phe Ser Pro Lys Asp Val Leu Val Arg Trp Leu Gln
 130 135 140

Gly Ser Gln Glu Leu Pro Arg Glu Lys Tyr Leu Thr Trp Ala Ser Arg
 145 150 155 160

Gln Glu Pro Ser Gln Gly Thr Thr Thr Phe Ala Val Thr Ser Ile Leu
 165 170 175

Arg Val Ala Ala Glu Asp Trp Lys Lys Gly Asp Thr Phe Ser Cys Met
 180 185 190

Val Gly His Glu Ala Leu Pro Leu Ala Phe Thr Gln Lys Thr Ile Asp
 195 200 205

Arg

<210> 74

<211> 209

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 74

Cys His Pro Arg Leu Ser Leu His Arg Pro Ala Leu Glu Asp Leu Leu
 1 5 10 15

Leu Gly Ser Glu Ala Asn Leu Thr Cys Thr Leu Thr Gly Leu Arg Asp
 20 25 30

Ala Ser Gly Ala Thr Phe Thr Trp Thr Pro Ser Ser Gly Lys Ser Ala
 35 40 45

Val Gln Gly Pro Pro Glu Arg Asp Leu Cys Gly Cys Tyr Ser Val Ser
 50 55 60

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

Thr Cys Thr Ala Ala His Pro Glu Leu Lys Thr Pro Leu Thr Ala Asn
 85 90 95

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

Pro Pro Ser Glu Glu Leu Ala Leu Asn Glu Leu Val Thr Leu Thr Cys
 115 120 125

Leu Ala Arg Gly Phe Ser Pro Lys Asp Val Leu Val Arg Trp Leu Gln
 130 135 140

Gly Ser Gln Glu Leu Pro Arg Glu Lys Tyr Leu Thr Trp Ala Ser Arg
145 150 155 160

Gln Glu Pro Ser Gln Gly Thr Thr Thr Phe Ala Val Thr Ser Ile Leu
 165 170 175

Arg Val Ala Ala Glu Asp Trp Lys Lys Gly Asp Thr Phe Ser Cys Met
 180 185 190

Val Gly His Glu Ala Leu Pro Leu Ala Phe Thr Gln Lys Thr Ile Asp
 195 200 205

Arg

<210> 75

<211> 212

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 75

Thr Ala Ile Arg Val Phe Ala Ile Pro Pro Ser Phe Ala Ser Ile Phe

1 5 10 15

Leu Thr Lys Ser Thr Lys Leu Thr Cys Leu Val Thr Asp Leu Thr Thr
20 25 30

Tyr Asp Ser Val Thr Ile Ser Trp Thr Arg Gln Asn Gly Glu Ala Val
35 40 45

Lys Thr His Thr Asn Ile Ser Glu Ser His Pro Asn Ala Thr Phe Ser
50 55 60

Ala Val Gly Glu Ala Ser Ile Cys Glu Asp Asp Trp Asn Ser Gly Glu
65 70 75 80

Arg Phe Thr Cys Thr Val Thr His Thr Asp Leu Pro Ser Pro Leu Lys
85 90 95

Gln Thr Ile Ser Arg Pro Lys Gly Val Ala Leu His Arg Pro Asp Val
100 105 110

Tyr Leu Leu Pro Pro Ala Arg Glu Gln Leu Asn Leu Arg Glu Ser Ala
115 120 125

Thr Ile Thr Cys Leu Val Thr Gly Phe Ser Pro Ala Asp Val Phe Val
130 135 140

Gln Trp Met Gln Arg Gly Gln Pro Leu Ser Pro Glu Lys Tyr Val Thr
145 150 155 160

Ser Ala Pro Met Pro Glu Pro Gln Ala Pro Gly Arg Tyr Phe Ala His
165 170 175

Ser Ile Leu Thr Val Ser Glu Glu Glu Trp Asn Thr Gly Glu Thr Tyr
180 185 190

Thr Cys Val Val Ala His Glu Ala Leu Pro Asn Arg Val Thr Glu Arg
195 200 205

Thr Val Asp Lys

210

<210> 76

<211> 208

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 76

Ala Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu

1 5 10 15

Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser

20 25 30

His Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu

35 40 45

Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr

50 55 60

Phe Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Val His Gln Asp Trp Leu Asn

65 70 75 80

Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ala Pro

85 90 95

Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Thr Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln

100 105 110

Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val

115 120 125

Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val

130 135 140

Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro

145 150 155 160

Pro Met Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr

165 170 175

Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val

180 185 190

Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu

195 200 205

<210> 77

<211> 208

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 77

Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu

1 5 10 15

Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser

20 25 30

His Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Lys Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu

35 40 45

Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr

50 55 60

Phe Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn

65 70 75 80

Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro

85 90 95

Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Thr Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln

100 105 110

Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val
 115 120 125

Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val
 130 135 140

Glu Trp Glu Ser Ser Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Asn Thr Thr Pro
 145 150 155 160

Pro Met Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr
 165 170 175

Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Ile Phe Ser Cys Ser Val
 180 185 190

Met His Glu Ala Leu His Asn Arg Phe Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu
 195 200 205

<210> 78

<211> 208

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 78

Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu
 1 5 10 15

Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser
 20 25 30

His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu
 35 40 45

Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr
 50 55 60

Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn
65 70 75 80

Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro
 85 90 95

Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln
 100 105 110

Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val
 115 120 125

Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val
 130 135 140

Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro
145 150 155 160

Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr
 165 170 175

Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val
 180 185 190

Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu
 195 200 205

<210> 79

<211> 208

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<221> MOD_RES

<222> (80)..(80)

<223> Variable amino acid

<220>

<221> MOD_RES

<222> (90)..(90)

<223> Variable amino acid

<220>

<221> MOD_RES

<222> (103)..(103)

<223> Variable amino acid

<220>

<221> MOD_RES

<222> (105)..(105)

<223> Variable amino acid

<220>

<221> MOD_RES

<222> (181)..(181)

<223> Variable amino acid

<400> 79

Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu

1 5 10 15

Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser

20 25 30

Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu

35 40 45

Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr

50 55 60

Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Xaa

65 70 75 80

Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Xaa Lys Gly Leu Pro Ser Ser
 85 90 95

Ile Glu Lys Thr Ile Ser Xaa Ala Xaa Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln
 100 105 110

Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val
 115 120 125

Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val
 130 135 140

Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro
 145 150 155 160

Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr
 165 170 175

Val Asp Lys Ser Xaa Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val
 180 185 190

Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu
 195 200 205

<210> 80

<211> 210

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 80

Arg Gly Val Ser Ala Tyr Leu Ser Arg Pro Ser Pro Phe Asp Leu Phe
 1 5 10 15

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

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

Val Asn His Ser Thr Arg Lys Glu Glu Lys Gln Arg Asn Gly Thr Leu
 50 55 60

Thr Val Thr Ser Thr Leu Pro Val Gly Thr Arg Asp Trp Ile Glu Gly
 65 70 75 80

Glu Thr Tyr Gln Cys Arg Val Thr His Pro His Leu Pro Arg Ala Leu
 85 90 95

Met Arg Ser Thr Thr Lys Thr Ser Gly Pro Arg Ala Ala Pro Glu Val
 100 105 110

Tyr Ala Phe Ala Thr Pro Glu Trp Pro Gly Ser Arg Asp Lys Arg Thr
 115 120 125

Leu Ala Cys Leu Ile Gln Asn Phe Met Pro Glu Asp Ile Ser Val Gln
 130 135 140

Trp Leu His Asn Glu Val Gln Leu Pro Asp Ala Arg His Ser Thr Thr
 145 150 155 160

Gln Pro Arg Lys Thr Lys Gly Ser Gly Phe Phe Val Phe Ser Arg Leu
 165 170 175

Glu Val Thr Arg Ala Glu Trp Glu Gln Lys Asp Glu Phe Ile Cys Arg
 180 185 190

Ala Val His Glu Ala Ala Ser Pro Ser Gln Thr Val Gln Arg Ala Val
 195 200 205

Ser Val
 210

<210> 81

<211> 5

<212> PRT

<213> Seqüência Artificial

<220>

<223> Descrição artificial de seqüência: Peptídeo sintético

<400> 81

Leu Leu Gly Gly Pro

1 5

<210> 82

<211> 25

<212> PRT

<213> Seqüência Artificial

<220>

<223> Descrição artificial de seqüência: Peptídeo sintético

<220>

<221> MOD_RES

<222> (3)..(22)

<223> a região pode englobar entre 2 e 20 amino ácidos variáveis

<400> 82

Leu Leu Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa

1 5 10 15

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Gly Gly Pro

20 25

<210> 83

<211> 25

<212> PRT

<213> Seqüência Artificial

<220>

<223> Descrição artificial de seqüência: Peptídeo sintético

<220>

<221> MOD_RES

<222> (4)..(23)

<223> a região pode englobar entre 2 e 20 amino ácidos variáveis

<400> 83

Leu Leu Gly Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
1 5 10 15

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Gly Pro
 20 25

<210> 84

<211> 25

<212> PRT

<213> Seqüênica Artificial

<220>

<223> Descrição artificial de seqüência: Peptídeo sintético

<220>

<221> MOD_RES

<222> (5)..(24)

<223> a região pode englobar entre 2 e 20 amino ácidos variáveis

<400> 84

Leu Leu Gly Gly Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
1 5 10 15

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Pro
 20 25

<210> 85

<211> 5

<212> PRT

<213> Seqüência Artificial Sequenc

<220>

<223> Descrição artificial de seqüência: Peptídeo sintético

<400> 85

Asp Val Ser His Glu

1 5

<210> 86

<211> 25

<212> PRT

<213> Seqüência Artificial

<220>

<223> Descrição Artificial de Seqüência: Peptídeo sintético

<220>

<221> MOD_RES

<222> (3)..(22)

<223> a região pode englobar entre 2 e 20 amino ácidos variáveis

<400> 86

Asp Val Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa

1 5 10 15

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Ser His Glu

20 25

<210> 87

<211> 25

<212> PRT

<213> Seqüênica Artificial

<220>

<223> Descrição artificial de seqüência: Peptídeo sintético

<220>

<221> MOD_RES

<222> (4)..(23)

<223> a região pode englobar entre 2 e 20 amino ácidos variáveis

<400> 87

Asp Val Ser Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa

1 5 10 15

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa His Glu

20 25

<210> 88

<211> 6

<212> PRT

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> Descrição artificial de sequência: Peptídeo sintético

<400> 88

Ala Leu Pro Ala Pro Ile

1 5

<210> 89

<211> 26

<212> PRT

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> Descrição artificial de sequência: Peptídeo sintético

<220>

<221> MOD_RES

<222> (3)..(22)

<223> a região pode englobar entre 2 e 20 amino ácidos variáveis

<400> 89

Ala Leu Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa

1 5 10 15

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Pro Ala Pro Ile

20 25

<210> 90

<211> 26

<212> PRT

<213> Seqüência Artificial

<220>

<223> Descrição artificial de seqüência: Peptídeo sintético

<220>

<221> MOD_RES

<222> (4)..(23)

<223> a região pode englobar entre 2 e 20 amino ácidos variáveis

<400> 90

Ala Leu Pro Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa

1 5 10 15

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Ala Pro Ile

20 25

<210> 91

<211> 26

<212> PRT

<213> Seqüência Artificial

<220>

<223> Descrição artificial de seqüência: Peptídeo sintético

<220>

<221> MOD_RES

<222> (5)..(24)

<223> a região pode englobar entre 2 e 20 amino ácidos variáveis

<400> 91

Ala Leu Pro Ala Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa

1 5 10 15

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Pro Ile

20 25

<210> 92

<211> 306

<212> PRT

<213> Seqüência Artificial

<220>

<223> Descrição artificial de seqüência: Peptídeo sintético

<220>

<221> MOD_RES

<222> (1)..(100)

<223> region may encompass between 1 and 100 variable amino acids

<220>

<221> MOD_RES

<222> (104)..(203)

<223> region may encompass between 1 and 100 variable amino acids

<220>

<221> MOD_RES

<222> (207)..(306)

<223> region may encompass between 1 and 100 variable amino acids

<400> 92

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 1 5 10 15

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 20 25 30

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 35 40 45

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 50 55 60

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 65 70 75 80

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 85 90 95

Xaa Xaa Xaa Xaa Asn Ser Thr Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 100 105 110

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 115 120 125

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 130 135 140

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 145 150 155 160

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 165 170 175

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 180 185 190

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Asn Ser Thr Xaa Xaa

195 200 205

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa

210 215 220

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa

225 230 235 240

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa

245 250 255

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa

260 265 270

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa

275 280 285

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa

290 295 300

Xaa Xaa

305

<210> 93

<211> 9

<212> PRT

<213> Seqüência Artificial

<220>

<223> Descrição artificial de seqüência: Peptídeo sintético

<220>

<221> MOD_RES

<222> (1)..(1)

<223> Tyr or Phe

<220>

<221> MOD_RES

<222> (5)..(5)

<223> Tyr or Phe

<220>

<221> MOD_RES

<222> (9)..(9)

<223> Tyr or Phe

<400> 93

Xaa Asn Ser Thr Xaa Asn Ser Thr Xaa

1 5

<210> 94

<211> 6

<212> PRT

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> Descrição artificial de sequência: Peptídeo sintético

<400> 94

Tyr Pro Ser Asp Ile Ala

1 5

<210> 95

<211> 8

<212> PRT

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> Descrição artificial de sequência: Peptídeo sintético

<400> 95

Tyr Pro Asn Ser Thr Asp Ile Ala

1 5

<210> 96

<211> 9

<212> PRT

<213> Seqüência Artificial

<220>

<223> Descrição artificial de seqüência: Peptídeo sintético

<400> 96

Tyr Asn Ser Thr Pro Ser Asp Ile Ala

1 5

<210> 97

<211> 14

<212> PRT

<213> Seqüência Artificial

<220>

<223> Descrição artificial de seqüência: Peptídeo sintético

<400> 97

Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln

1 5 10

<210> 98

<211> 14

<212> PRT

<213> Seqüência Artificial

<220>

<223> Descrição artificial de seqüência: Peptídeo sintético

<400> 98

Cys Met Val Gly His Glu Ala Leu Pro Leu Ala Phe Thr Gln

1 5 10

<210> 99

<211> 4

<212> PRT

<213> Seqüência Artificial

<220>

<223> Descrição artificial de seqüência: Peptídeo sintético

<400> 99

Gln Pro Glu Asn

1

<210> 100

<211> 6

<212> PRT

<213> Seqüência Artificial

<220>

<223> Descrição artificial de seqüência: Peptídeo sintético

<400> 100

Gln Glu Leu Pro Arg Glu

1

5

<210> 101

<211> 9

<212> PRT

<213> Seqüência Artificial

<220>

<223> Descrição artificial de seqüência: Peptídeo sintético

<400> 101

Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr

1

5

<210> 102

<211> 9

<212> PRT

<213> Seqüência Artificial

<220>

<223> Descrição artificial de seqüência: Peptídeo sintético

<400> 102

Lys Asp Thr Leu Leu Ile Ser Arg Thr

1 5

<210> 103

<211> 9

<212> PRT

<213> Seqüência Artificial

<220>

<223> Descrição artificial de seqüência: Peptídeo sintético

<400> 103

Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn

1 5

<210> 104

<211> 9

<212> PRT

<213> Seqüência Artificial

<220>

<223> Descrição artificial de seqüência: Peptídeo sintético

<400> 104

Asp Ile Ala Val Arg Trp Glu Ser Asn

1 5

<210> 105

<211> 5

<212> PRT

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> Descrição artificial de sequência: Peptídeo sintético

<400> 105

Tyr Asn Ser Thr Tyr

1 5

<210> 106

<211> 9

<212> PRT

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> Descrição artificial de sequência: Peptídeo sintético

<400> 106

Tyr Asn Ser Thr Tyr Asn Ser Thr Tyr

1 5

REIVINDICAÇÕES

1. Proteína de ligação, **CARACTERIZADA** pelo fato de que compreende um ou mais domínio(s) CH2 e/ou CH3, de articulação de região constante de imunoglobulina onde os referidos um ou mais domínios CH2 e/ou CH3 de região constante e/ou articulação
5 compreende uma inserção e/ou uma deleção de um ou amino ácidos onde a referida proteína de ligação exhibe uma afinidade de ligação alterada para um ou mais receptores Fc cognatos.

2. Proteína de ligação, de acordo com a reivindicação 1, **CARACTERIZADA** pelo fato de que a referida proteína de ligação é selecionada a partir do grupo que consiste em
10 um anticorpo, um fragmento de anticorpo, e um produto imunofarmacêutico modular pequeno (produtos SMIP™).

3. Proteína de ligação, de acordo com a reivindicação 1, a referida proteína de ligação sendo **CARACTERIZADA** pelo fato de que compreende um ou mais domínios CH2 e/ou CH3 de articulação de cadeia pesada de imunoglobulina IgG modificados, onde o
15 referido um ou mais domínios CH2 e/ou CH3 de articulação de cadeia pesada de imunoglobulina IgG é modificada pela inserção de um ou mais amino ácidos(s) e/ou deleção de um ou mais amino ácidos(s), onde a referida proteína de ligação se liga a um receptor Fc selecionado a partir do grupo que consiste em FcγRI (CD64), FcγRII (CD32), e FcγRIII (CD16) com uma maior afinidade em comparação à proteína de ligação correspondente
20 compreendendo domínios CH2 e/ou CH3 de articulação de cadeia pesadas de imunoglobulina IgG não modificada.

4. Proteína de ligação, de acordo com a reivindicação 3, **CARACTERIZADA** pelo fato de que o referido domínio IgG modificado é um domínio CH2 IgG₁ modificado, um domínio CH2 IgG₂ modificado, um domínio CH2 IgG₃ modificado, e/ou um domínio CH2 IgG₄
25 modificado.

5. Proteína de ligação, de acordo com a reivindicação 4, **CARACTERIZADA** pelo fato de que o referido domínio IgG modificado é um domínio CH2 IgG₁ modificado e/ou um domínio CH2 IgG₃ modificado e onde o referido domínio CH2 IgG₁ modificado e/ou domínio CH2 IgG₃ modificado compreende uma ou mais deleção de amino ácido a partir de e/ou
30 inserção de amino ácido dentro da estrutura de alça proximal de articulação L-L-G-G-P do domínio CH2 IgG₁ e/ou IgG₃ CH2.

6. Proteína de ligação, de acordo com a reivindicação 5, **CARACTERIZADA** pelo fato de que a referida proteína de ligação compreende um ou mais inserção(ões) de um ou mais amino ácido(s) dentro da estrutura de alça proximal de articulação L-L-G-G-P.

7. Proteína de ligação, de acordo com a reivindicação 6, **CARACTERIZADA** pelo fato de que a referida estrutura de alça proximal de articulação compreende uma inserção de um ou mais amino ácido(s) na posição "*" de modo que a estrutura de alça proximal de
35

articulação compreende uma seqüência selecionada a partir do grupo que consiste em L-L-*G-G-P, L-L-G-*G-P, e L-L-G-G-*P, onde "*" indica a inserção de pelo menos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, ou 20 amino ácidos.

8. Proteína de ligação, de acordo com a reivindicação 7, **CARACTERIZADA** pelo fato de que o referido "*" compreende um ou mais amino ácidos selecionados a partir do grupo que consiste em Ala, Gly, Ile, Leu, e Val.

9. Proteína de ligação, de acordo com a reivindicação 4, **CARACTERIZADA** pelo fato de que o referido domínio IgG modificado é um domínio CH2 IgG1 modificado, um domínio CH2 IgG₂ modificado, e/ou um domínio CH2 IgG3 modificado e onde o referido domínio CH2 IgG1 modificado, domínio CH2 IgG₂ modificado, e/ou domínio CH2 IgG3 modificado compreende uma ou mais deleção de amino ácido a partir de e/ou inserção de amino ácido dentro da estrutura de alça BC D-V-S-H-E do domínio CH2 IgG₁, IgG₂, e/ou IgG₃.

10. Proteína de ligação, de acordo com a reivindicação 9, **CARACTERIZADA** pelo fato de que a referida proteína de ligação compreende um ou mais inserção(ões) de um ou mais amino ácido(s) dentro da estrutura de alça BC D-V-S-H-E.

11. Proteína de ligação, de acordo com a reivindicação 10, **CARACTERIZADA** pelo fato de que a referida estrutura de alça BC compreende uma inserção de um ou mais amino ácido(s) na posição "*" de modo que a estrutura de alça BC compreende uma seqüência selecionada a partir do grupo que consiste em D-V-*S-H-E e D-V-S-*H-E, onde "*" indica a inserção de pelo menos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, ou 20 amino ácidos.

12. Proteína de ligação, de acordo com a reivindicação 11, **CARACTERIZADA** pelo fato de que o referido "*" compreende um ou mais amino ácidos selecionados a partir do grupo que consiste em Ala, Gly, Ile, Leu, e Val.

13. Proteína de ligação, de acordo com a reivindicação 4, **CARACTERIZADA** pelo fato de que o referido domínio IgG modificado é um domínio CH2 IgG1 modificado e/ou um domínio CH2 IgG3 modificado, onde o referido domínio CH2 IgG1 modificado e/ou um domínio CH2 IgG3 modificado compreende uma ou mais deleção de amino ácido a partir de e/ou inserção de amino ácido dentro da estrutura de alça FG, A-L-P-A-P-I do domínio CH2 IgG₁ e/ou IgG₃.

14. Proteína de ligação, de acordo com a reivindicação 13, **CARACTERIZADA** pelo fato de que a referida proteína de ligação compreende uma ou mais inserção(ões) de um ou mais amino ácido(s) dentro da estrutura de alça FG A-L-P-A-P-I.

15. Proteína de ligação, de acordo com a reivindicação 14, **CARACTERIZADA** pelo fato de que a referida estrutura de alça FG compreende uma inserção de um ou mais amino ácido(s) na posição "*" de modo que a estrutura de alça BC compreende uma seqüência

selecionada a partir do grupo que consiste em A-L-*P-A-P-I, A-L-P-*A-P-I, e A-L-P-A-*P-I, onde "*" indica a inserção de pelo menos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, ou 20 amino ácidos.

16. Proteína de ligação, de acordo com a reivindicação 15, **CARACTERIZADA** pelo fato de que referido "*" compreende um ou mais amino ácidos selecionados a partir do grupo que consiste em Ala, Gly, Ile, Leu, e Val.

17. Proteína de ligação, de acordo com a reivindicação 1, a referida proteína de ligação sendo **CARACTERIZADA** pelo fato de que compreende um ou mais domínios CH2 e/ou CH3 de articulação de cadeia pesada IgG modificados, onde os referidos um ou mais domínios CH2 e/ou CH3 de articulação de cadeia pesada é modificado pela inserção de uma ou mais seqüências de glicosilação N-ligada(s) em uma ou mais posição que é proximal e/ou distal a uma seqüência de glicosilação nativa, cuja seqüência de glicosilação é suficiente para alcançar a glicosilação N-ligada na posição de inserção, onde a referida proteína de ligação modificada se liga a um receptor Fc selecionado a partir do grupo que consiste em FcγRI (CD64), FcγRII (CD32), e FcγRIII (CD16) com uma afinidade superior em comparação à proteína de ligação correspondente compreendendo os domínios CH2 e/ou CH3 de articulação de cadeia pesadas de imunoglobulina IgG não modificado.

18. Proteína de ligação, de acordo com a reivindicação 17, **CARACTERIZADA** pelo fato de que o referido domínio CH2 e/ou CH3 de articulação, é um domínio CH2 e/ou CH3 de articulação IgG1, um domínio CH2 e/ou CH3 de articulação IgG2, um domínio CH2 e/ou CH3 de articulação IgG3, e/ou um domínio CH2 e/ou CH3 de articulação IgG4 compreendendo a inserção de uma ou mais seqüência de glicosilação N-ligada N-X-(S/T), onde X é qualquer amino ácido proximal a e/ou distal ao campo de glicosilação N-ligada no domínio CH2 e/ou CH3 de articulação de imunoglobulina IgG nativa correspondente.

19. Proteína de ligação, de acordo com a reivindicação 18, **CARACTERIZADA** pelo fato de que a referida proteína de ligação compreende um domínio de CH2 IgG onde o referido domínio CH2 compreende uma inserção de uma ou mais seqüência N-X-(S/T) adjacente a e/ou dentro de 0 a 100 amino ácidos amino-terminais e/ou carbóxi-terminais para a seqüência N-S-T nativa dentro da alça DE do referido Domínio de CH2 IgG.

20. Proteína de ligação, de acordo com a reivindicação 19, **CARACTERIZADA** pelo fato de que o referido domínio de CH2 IgG compreende a seqüência de amino ácido N-S-T inserida adjacente a e/ou dentro de 0 a 100 amino ácidos amino-terminais e/ou carbóxi-terminais para a seqüência N-S-T nativa de modo que a seqüência de amino ácido X-N-S-T-Z nativa é modificada para (AA^a)-N-S-T-(AA^b)-N-S-T-(AA^c) onde cada um de AA^a, AA^b, e AA^c independentemente designa de 1 a 100 amino ácidos.

21. Proteína de ligação, de acordo com a reivindicação 20, **CARACTERIZADA** pelo fato de que o referido domínio de CH2 IgG é modificado de modo que a seqüência de amino

ácido N-S-T é inserida dentro de um amino ácido a partir da seqüência N-S-T nativa de modo que a seqüência de amino ácido X-N-S-T-Z nativa é modificada para X-N-S-T-Z-N-S-T-Z, onde X e Z são independentemente selecionados a partir de Tyr (Y) e Phe (F).

22. Proteína de ligação, de acordo com a reivindicação 18, **CARACTERIZADA** pelo fato de que a referida seqüência de glicosilação N-ligada é inserida dentro da alça BC de um ou mais domínio CH3 IgG₁, IgG₂, IgG₃, e/ou IgG₄ distal ao referido campo nativo da glicosilação N-ligada dentro do domínio CH2 de modo que a seqüência de amino ácido nativa Y-P-S-D-I-A é modificada para Y-P-N-S-T-D-I-A ou para Y-N-S-T-P-S-D-I-A.

23. Proteína de ligação, de acordo com a reivindicação 3, **CARACTERIZADA** pelo fato de que a referida proteína de ligação compreende um ou mais domínios CH2 e/ou CH3 de articulação de cadeia pesada da primeira classe de imunoglobulina selecionada a partir de IgA, IgD, IgE, IgG, e IgM, onde a proteína de ligação é modificada por substituição de amino ácido e/ou inserção de amino ácido na seqüência amino primária do referido um ou mais domínios CH2 e/ou CH3 de articulação de cadeia pesada da primeira classe de imunoglobulina para gerar proteína de ligação capaz de ligação a um ou mais receptor Fc da segunda classe de imunoglobulina, onde a referida segunda classe de imunoglobulina é distinta da referida primeira classe de imunoglobulina.

24. Proteína de ligação, de acordo com a reivindicação 23, **CARACTERIZADA** pelo fato de que a referida primeira classe de imunoglobulina é IgG e onde a referida segunda classe de imunoglobulina é IgA.

25. Proteína de ligação, de acordo com a reivindicação 24, **CARACTERIZADA** pelo fato de que a referida proteína de ligação é capaz de se ligar especificamente (a) um receptor Fc selecionado a partir do grupo que consiste em FcγRI (CD64), FcγRII (CD32), e FcγRIII (CD16) e (b) para FcαR (CD89).

26. Proteína de ligação, de acordo com a reivindicação 25, **CARACTERIZADA** pelo fato de que a referida proteína de ligação compreende uma ou mais substituição(ões) de amino ácido dentro da alça FG CH3 IgG e/ou um ou mais amino ácido substituição(ões) de amino ácido dentro da alça CD CH3 IgG.

27. Proteína de ligação, de acordo com a reivindicação 26, **CARACTERIZADA** pelo fato de que a referida proteína de ligação compreende a substituição da alça FG CH3 IgG compreendendo a seqüência de amino ácido C-S-V-M-H-E-A-L-H-N-H-Y-T-Q, ou uma porção da mesma, com a alça FG CH3 IgA compreendendo a seqüência de amino ácido C-M-V-G-H-E-A-L-P-L-A-F-T-Q, ou uma porção correspondente da mesma.

28. Proteína de ligação, de acordo com a reivindicação 27, **CARACTERIZADA** pelo fato de que a referida proteína de ligação compreende a substituição da alça CD CH3 IgG compreendendo a seqüência de amino ácido Q-P-E-N, ou uma porção da mesma, com a

alça CD CH3 IgA compreendendo a seqüência de amino ácido Q-E-L-P-R-E, ou uma porção da mesma.

29. Proteína de ligação, de acordo com a reivindicação 28, **CARACTERIZADA** pelo fato de que a referida proteína de ligação compreende a substituição de ambas as alças FG CH3 IgG compreendendo a seqüência de amino ácido C-S-V-M-H-E-A-L-H-N-H-Y-T-Q, ou uma porção da mesma, com a alça FG CH3 IgA compreendendo a seqüência de amino ácido C-M-V-G-H-E-A-L-P-L-A-F-T-Q, ou uma porção correspondente da mesma, e a alça CD CH3 IgG compreendendo a seqüência de amino ácido Q-P-E-N, ou uma porção da mesma, com a alça CD CH3 IgA compreendendo a seqüência de amino ácido Q-E-L-P-R-E, ou uma porção da mesma.

30. Proteína de ligação, de acordo com qualquer uma das reivindicações 27 – 29, **CARACTERIZADA** pelo fato de que adicionalmente compreende a substituição do amino ácido CH3 de cadeia pesada IgG Met na posição de amino ácido CH3 no. 28 dentro da seqüência K-D-T-L-M-I-S-R-T com o amino ácido Leu de modo que a proteína de ligação adicionalmente compreende a seqüência de amino ácido K-D-T-L-L-I-S-R-T.

31. A proteína de ligação de acordo com qualquer uma das reivindicações 27 – 29, **CARACTERIZADA** pelo fato de que adicionalmente compreende a substituição do amino ácido CH3 de cadeia IgG Glu na posição de amino ácido CH3 no. 157 dentro da seqüência D-I-A-V-E-W-E-S-N com o amino ácido Arg de modo que a proteína de ligação adicionalmente compreende a seqüência de amino ácido D-I-A-V-R-W-E-S-N.

Figura 1

										Section 1
										78
IgG	(1)	1	10	20	30	40	50	60		
1H3W	(1)	TCPPCPAPELLGGPSWFLFPKPKDTLMISRTPEWTCVWVDVSHEDPOVKFNQYVDGVOVHNARTKPREOOYNSTYRV								
IgA	(1)	-----ACHPRISLHRP-ALKD LLLGSEANLTCTLTCLRDAS-GVTFWTWPS--SGKSAVQGPPPERDLGGCYSV								
Consensus	(1)	P L L P D LLI LTC L L V F W A P E Y V								
										Section 2
										158
1H3W	(79)	79	90	100	110	120	130	140		
10WVO	(65)	SSVLPGCARPWNHGKTETCTAAYPSKTIPLTATLSKS-GNTFRPEVHLLPPPSEELALNELVTLTCLARGFSPKQMLV								
Consensus	(79)	SVL	W	GK F C A	PI	TISKA GN	P VH LPP S E	VSLTCL KGF P DI V		
										Section 3
										229
1H3W	(157)	157	170	180	190	200	210	220		
10WVO	(142)	RWLOGSDELPRHKYLTWASROEPSOGTTTFAMTSILRVAEDWKKGDTFSCHVGHREALPLAKTCTEDRLACK								
Consensus	(157)	W	O P	Y T D	SF L S L V	W G	FSC V HEAL	FTCKSI	GK	

Região 1 = Loop CD

Região 2 = Loop FG

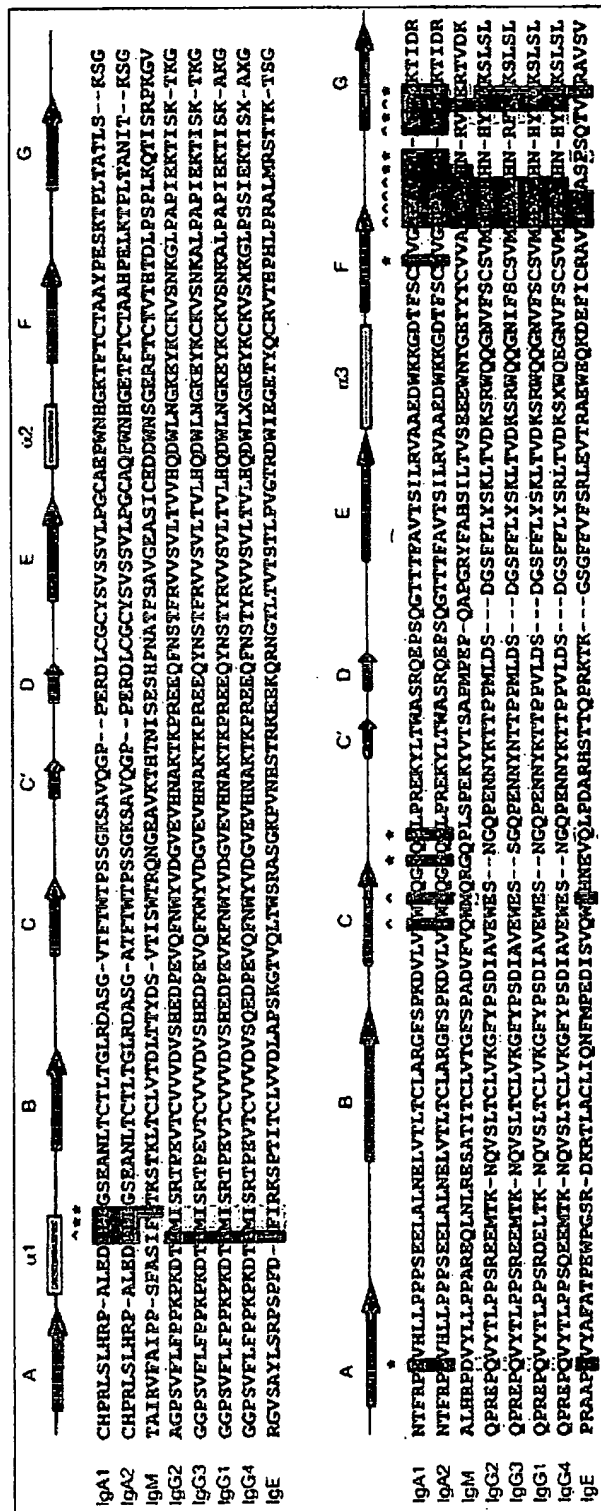
Figura 2

		Section 1				
	(1)	1	10	20	30	40
CH2-CH3 wt	(1)	PELLGGPSVFL	FPPKPKDTLL	LSRTPEVT	CVVVDVSHED	PEVKFNWYV
CH2-CH3 version 1	(1)	PELLGGPSVFL	FPPKPKDTLLL	LSRTPEVT	CVVVDVSHED	PEVKFNWYV
CH2-CH3 version 2	(1)	PELLGGPSVFL	FPPKPKDTLLL	LSRTPEVT	CVVVDVSHED	PEVKFNWYV
CH2-CH3 version 3	(1)	PELLGGPSVFL	FPPKPKDTLLL	LSRTPEVT	CVVVDVSHED	PEVKFNWYV
Consensus	(1)	PELLGGPSVFL	FPPKPKDTLLL	LSRTPEVT	CVVVDVSHED	PEVKFNWYV
		Section 2				
	(40)	40	60	70	80	90
CH2-CH3 wt	(40)	DGVEVHN	AKTKPREEQY	NSTYRVS	SULTVLHQD	WLNKGEYKCKVSNKA
CH2-CH3 version 1	(40)	DGVEVHN	AKTKPREEQY	NSTYRVS	SULTVLHQD	WLNKGEYKCKVSNKA
CH2-CH3 version 2	(40)	DGVEVHN	AKTKPREEQY	NSTYRVS	SULTVLHQD	WLNKGEYKCKVSNKA
CH2-CH3 version 3	(40)	DGVEVHN	AKTKPREEQY	NSTYRVS	SULTVLHQD	WLNKGEYKCKVSNKA
Consensus	(40)	DGVEVHN	AKTKPREEQY	NSTYRVS	SULTVLHQD	WLNKGEYKCKVSNKA
		Section 3				
	(97)	97	110	120	130	144
CH2-CH3 wt	(97)	LPAP IEKT	ISKAKGQPREP	QUYTLP	PSRDELTKNQ	VS LTCLVKG
CH2-CH3 version 1	(97)	LPAP IEKT	ISKAKGQPREP	QUYTLP	PSRDELTKNQ	VS LTCLVKG
CH2-CH3 version 2	(97)	LPAP IEKT	ISKAKGQPREP	QUYTLP	PSRDELTKNQ	VS LTCLVKG
CH2-CH3 version 3	(97)	LPAP IEKT	ISKAKGQPREP	QUYTLP	PSRDELTKNQ	VS LTCLVKG
Consensus	(97)	LPAP IEKT	ISKAKGQPREP	QUYTLP	PSRDELTKNQ	VS LTCLVKG
		Section 4				
	(146)	146	150	160	170	180
CH2-CH3 wt	(146)	DI AVEWESNG	QELPENNYKT	TPPVLDSDG	SFFLYSKLT	VDKSRWQ QGN
CH2-CH3 version 1	(146)	DI AVEWESNG	QELPENNYKT	TPPVLDSDG	SFFLYSKLT	VDKSRWQ QGN
CH2-CH3 version 2	(146)	DI AVEWESNG	QELPENNYKT	TPPVLDSDG	SFFLYSKLT	VDKSRWQ QGN
CH2-CH3 version 3	(146)	DI AVEWESNG	QELPENNYKT	TPPVLDSDG	SFFLYSKLT	VDKSRWQ QGN
Consensus	(146)	DI AVEWESNG	QELPENNYKT	TPPVLDSDG	SFFLYSKLT	VDKSRWQ QGN
		Section 5				
	(193)	193	200	210	218	
CH2-CH3 wt	(193)	VFS CMVMHE	ALPLAFT	QKSLSL	SPGK	
CH2-CH3 version 1	(193)	VFS CMVMHE	ALPLAFT	QKSLSL	SPGK	
CH2-CH3 version 2	(193)	VFS CMVMHE	ALPLAFT	QKSLSL	SPGK	
CH2-CH3 version 3	(193)	VFS CMVMHE	ALPLAFT	QKSLSL	SPGK	
Consensus	(193)	VFS CMVMHE	ALPLAFT	QKSLSL	SPGK	

CD Loop

FG Loop

Figura 3



RESUMO

“PROTEÍNAS DE LIGAÇÃO COMPREENDENDO ARTICULAÇÃO DE IMUNOGLOBULINA E REGIÕES FC DOTADAS DE FUNÇÕES EFETORAS FC ALTERADAS”

- 5 A presente invenção proporciona proteínas de ligação compreendendo um ou mais domínio CH2 e/ou CH3 de região de articulação Fc de imunoglobulina onde um ou mais domínios CH2 e/ou CH3 de região constante e/ou articulação é modificado para alterar a afinidade e/ou especificidade de ligação da proteína de ligação para um receptor cognato (*por exemplo*, um Receptor Fc) e/ou para proporcionar uma ou mais novas especificidades
- 10 de ligação a região de articulação e/ou constante que a imunoglobulina não modificada correspondente não possui (*por exemplo*, afinidade para classe distinta de receptor cognato distinto da classe de receptor cognato ao qual a proteína de ligação não modificada se liga especificamente). As proteínas de ligação de acordo com a presente invenção incluem, por exemplo, anticorpos modificados, fragmentos de anticorpos, proteínas de ligação
- 15 recombinantes, e proteínas de fusão de domínio imunoglobulina de ligação trabalhadas molecularmente por engenharia, incluindo os produtos imunofarmacêuticos modulares pequenos (produtos SMIP™).