República Federativa do Brasil
Ministério da Economia
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(21) BR 112021007529-1 A2

(22) Data do Depósito: 22/10/2019

(43) Data da Publicação Nacional: 03/08/2021

(54) Título: MÉTODO E BIBLIOTECA DE ANTICORPO

(51) Int. Cl.: C07K 16/28.

(30) Prioridade Unionista: 04/04/2019 GB 1904754.7; 09/04/2019 GB 1905032.7; 22/10/2018 GB 1817188.4.

(71) Depositante(es): FUSION ANTIBODIES PLC.

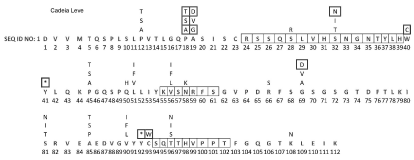
(72) Inventor(es): RICHARD BUICK; CHRISTOPHER SCOTT; DARRAGH MACCANN; LEONA MCGIRR; HUGH MORGAN; NATASHA CAMPBELL; JAMES MCCLORY; ANTHONY O?KANE.

(86) Pedido PCT: PCT GB2019053010 de 22/10/2019

(87) Publicação PCT: WO 2020/084298 de 30/04/2020

(85) Data da Fase Nacional: 20/04/2021

(57) Resumo: MÉTODO E BIBLIOTECA DE ANTICORPO. Esta divulgação se refere a métodos de geração de bibliotecas de anticorpo, bibliotecas de anticorpo produzidas usando tais métodos, e anticorpos variantes. Atualmente, os métodos de melhorar ligação de anticorpo (ensaios de maturação de afinidade) requerem a triagem de vastas bibliotecas de variantes de anticorpo (geralmente >1010) para identificar uma pequena fração de variantes com características melhoradas. A presente invenção envolve tomar a sequência de nucleotídeo da região determinante de estrutura e complementaridade de um anticorpo alvo e identificar motivos que seriam reconhecidos por desaminação de enzimas de hipermutação somática. Uma pequena biblioteca de variantes é, então, criada incorporando uma ou mais dessas mutações. Verificou-se que uma razão relativamente alta das variantes têm uma afinidade aumentada. A técnica da presente invenção foi demonstrada nos anticorpos trastuzumabe e Catepsina S, e as variantes produzidas também são reivindicadas.



“MÉTODO E BIBLIOTECA DE ANTICORPO”

Campo da Invenção

[001]A presente invenção se refere a métodos de geração de bibliotecas de anticorpo, bibliotecas de anticorpo produzidas usando tais métodos, e anticorpos variantes.

Fundamentos da Invenção

[002]A afinidade do anticorpo é a medida da força da interação entre o anticorpo e a proteína à qual ele se liga especificamente, como uma razão entre a taxa de associação e a taxa de dissociação. Existem muitas razões pelas quais a otimização dessa razão é desejável. O aumento da afinidade pode significar que um anticorpo terapêutico é mais eficaz em uma determinada dose, ou pode significar que menos do fármaco é necessário por dose, e os testes de diagnóstico podem melhorar a sensibilidade. Reduzir a afinidade também pode ser benéfico para alguns fármacos que requerem penetração no tecido e, portanto, uma dissociação mais rápida. Também foi demonstrado que os anticorpos biespecíficos requerem ajuste intrincado de afinidade de cada local de ligação a fim de maximizar a eficácia.

[003]As plataformas de maturação de afinidade existentes geralmente envolvem a criação de uma grande biblioteca de variantes por meio de mutagênese aleatória focada nas regiões determinantes de complementaridade de anticorpos (CDRs). Esse processo tem a desvantagem de rastrear um grande número de variantes (geralmente $>10^{10}$) para identificar uma pequena fração de variantes com características melhoradas.

Sumário da Invenção

[004]A presente invenção aborda muitos dos problemas da técnica anterior. Conforme descrito nos exemplos, os inventores mostraram surpreendentemente que, ao limitar as mutações a uma sequência de nucleotídeos que codifica uma determinada sequência de anticorpo para locais que correspondem a motivos de DNA

que são direcionados por enzimas envolvidas na hipermutação somática, uma biblioteca de variantes de uma determinada sequência de anticorpo pode ser criada, a biblioteca, quando comparada com aquelas preparadas por muitas tecnologias existentes, sendo relativamente pequena, mas compreendendo uma razão relativamente alta de variantes com afinidade aumentada, ou agregação, ou ponto de fusão, ou nível de expressão em células CHO ou combinações das mesmas . Os inventores exemplificaram a invenção utilizando dois anticorpos não relacionados, um anticorpo anti-CatepsinaS, Fsn0503h (Fusion Antibodies Ltd), e o anticorpo anti-HER2 trastuzumabe, (Herceptin®, Roche).

[005]Consequentemente, um primeiro aspecto da presente invenção fornece uma biblioteca de moléculas de anticorpo, em que cada molécula de anticorpo é uma variante de um anticorpo de referência, em que a sequência de aminoácido de cada molécula de anticorpo difere a partir da sequência de aminoácido do anticorpo de referência em um ou mais resíduos de aminoácido, em que cada um dos ditos resíduos de aminoácido são independentemente codificados a partir de um segmento de DNA da sequência de DNA que codifica a variante, em que o dito segmento de DNA da variante difere daquele da sequência de DNA correspondente que codifica o anticorpo de referência por uma alteração pontual em um motivo de DNA suscetível à desaminação por uma enzima indutora de hipermutação somática.

[006]Um segundo aspecto da invenção fornece um método para gerar/produzir uma biblioteca de moléculas de anticorpo variantes, em que as ditas moléculas de anticorpo variantes são variantes de um anticorpo de referência, o dito método compreendendo as etapas:

a) fornecer uma sequência de nucleotídeo que codifica o anticorpo de referência,

b) na dita sequência de nucleotídeo, identificar um ou mais motivos de DNA suscetível à desaminação por uma enzima indutora de hipermutação somática;

c) para um ou mais dos ditos motivos de DNA, selecionar pelo menos um resíduo de nucleotídeo variante para substituir um resíduo do dito motivo de DNA, em que a dita substituição resultará em uma sequência de nucleotídeo variante que codifica uma molécula de anticorpo variante tendo, em relação ao anticorpo de referência, uma alteração na sequência de aminoácido sendo codificada pelo dito motivo de DNA; e

d) repetir as etapas (b) e (c);

de modo que uma biblioteca contendo uma pluralidade de variantes do dito anticorpo de referência seja gerada.

[007]O anticorpo de referência pode ser qualquer molécula de anticorpo cujas variantes são desejadas ou necessárias. Em uma modalidade, o dito anticorpo de referência é uma molécula de anticorpo humanizada.

[008]Um terceiro aspecto da invenção fornece um método de geração de uma molécula de anticorpo variante, em que a dita molécula de anticorpo variante é uma variante de um anticorpo de referência, o dito método compreendendo as etapas:

a) fornecer uma sequência de nucleotídeo que codifica o anticorpo de referência,

b) na dita sequência de nucleotídeo, identificar um ou mais motivos de DNA suscetível à desaminação por uma enzima indutora de hipermutação somática;

c) para um ou mais dos ditos motivos de DNA, selecionar pelo menos um resíduo de nucleotídeo variante para substituir um resíduo do dito motivo de DNA, em que a dita substituição resultará em uma sequência de nucleotídeo variante que que codifica uma molécula de anticorpo variante tendo, em relação ao anticorpo de referência, uma alteração na sequência de aminoácido sendo codificada pelo dito motivo de DNA.

[009]Em uma modalidade da invenção, a dita enzima indutora de hipermutação somática é a Deaminase Induzida por Ativação (AID).

[010]Em modalidades da invenção, o dito motivo de DNA é DGYW ou WRCH, por exemplo, RGYW ou WRCY, onde D é adenina, guanina ou timina, R é adenina ou guanina, G é guanina, C é citosina, H é adenina ou citosina ou timina, W é adenina ou timina, e Y é citosina ou timina.

[011]O dito motivo de DNA pode estar em qualquer filamento do DNA. Onde existem mais do que um dos ditos motivos de DNA, os motivos podem se sobrepor.

[012]Os inventores mostraram que a biblioteca de anticorpo da invenção ou produzida de acordo com um método da invenção pode ser refinada, limitando ainda mais os membros da biblioteca às variantes resultantes de mutações no motivo de DNA direcionado por uma enzima indutora de hipermutação somática que não resulta em um códon STOP ou de fato em outros motivos na molécula de anticorpo variante que em relação ao anticorpo de referência seriam considerados potencialmente indesejáveis, por exemplo em termos de estabilidade ou ligação.

[013]Consequentemente, em certas modalidades da invenção, a sequência de DNA de cada variante não compreende (ou codifica) um local de desaminação, local de isomerização, local de glicosilação ligado a N ou local de oxidação que origina a partir da dita alteração pontual no dito motivo de DNA.

[014]Em algumas modalidades, um ou mais dos ditos motivos de DNA estão nas sequências de DNA que codificam CDRs da dita molécula de anticorpo. Entretanto, conforme descrito nos exemplos, os inventores mostraram que usando o método com alguns anticorpos de referência, as variantes geradas podem não ter quaisquer mutações em algumas CDRs em comparação com as CDRs correspondentes do anticorpo de referência.

[015]Em uma modalidade, as variantes não tem mudanças em uma ou mais de suas CDRs em comparação com as CDRs correspondentes da sequência de referência.

[016]Em uma tal modalidade, as variantes não tem mudanças na CDR1 de cadeia leve em comparação com a CDR correspondente da sequência de referência.

[017]Em uma outra tal modalidade, as variantes não tem mudanças na CDR2 de cadeia leve em comparação com a CDR correspondente da sequência de referência.

[018]Em uma outra tal modalidade, as variantes não tem mudanças na CDR3 de cadeia leve em comparação com a CDR correspondente da sequência de referência.

[019]Em uma outra tal modalidade, as variantes não tem mudanças na CDR1 de cadeia pesada em comparação com a CDR correspondente da sequência de referência.

[020]Em uma outra tal modalidade, as variantes não tem mudanças na CDR2 de cadeia pesada em comparação com a CDR correspondente da sequência de referência.

[021]Em uma outra tal modalidade, as variantes não tem mudanças na CDR3 de cadeia pesada em comparação com a CDR correspondente da sequência precursora.

[022]Além disso, conforme mostrado nos exemplos, para algumas variantes de anticorpos de referência, muitas das mutações que caracterizam as variantes podem estar nas regiões estruturais da moléculas de anticorpo variantes.

[023]Consequentemente, em modalidades particulares da biblioteca ou método da invenção, um ou mais dos ditos motivos de DNA estão nas sequências de DNA que codificam regiões estruturais da dita molécula de anticorpo. Em algumas tais modalidades, todos os ditos motivos de DNA estão nas sequências de DNA que codificam regiões estruturais da dita molécula de anticorpo.

[024]Em uma modalidade da invenção, maior que 20 %, por exemplo, maior que 40 %, maior que 50 %, maior que 60 %, maior que 70 %, maior que 80 % ou maior

que 90 % dos resíduos de nucleotídeo de cada anticorpo variante que diferem dos resíduos de nucleotídeo em posições correspondentes no anticorpo de referência são resíduos em um motivo de DNA suscetível à desaminação por uma enzima indutora de hipermutação somática.

[025]Em algumas modalidades da invenção, a sequência de nucleotídeo que codifica cada uma das ditas moléculas de anticorpo não difere daquela do anticorpo de referência em qualquer resíduo que não seja os resíduos do dito motivo de DNA.

[026]Uma biblioteca de anticorpo da invenção e/ou produzida usando o método da invenção pode ser ainda refinada para aumentar a razão de variantes de alta afinidade e/ou estabilidade.

[027]Uma biblioteca de anticorpo da invenção e/ou produzida usando o método da invenção pode ser ainda refinada para aumentar a razão de variantes com agregação diferencial, isto é, menos capazes de agregar uma à outra. Uma biblioteca de anticorpo da invenção e/ou produzida usando o método da invenção pode ser ainda refinada para aumentar a razão de variantes com características de ponto de fusão particulares. Uma biblioteca de anticorpo da invenção e/ou produzida usando o método da invenção pode ser ainda refinada para aumentar a razão de variantes que mostram um nível de expressão favorável ou desejado em células CHO. Uma biblioteca de anticorpo da invenção e/ou produzida usando o método da invenção pode ser ainda refinada para aumentar a razão de variantes com alta afinidade, estabilidade, características de agregação desejadas, características de ponto de fusão desejadas, características de nível de expressão desejadas ou combinações das mesmas.

[028]Assim, na invenção, o método pode ainda compreender determinar a afinidade e/ou estabilidade de ligação da dita molécula de anticorpo variante ao alvo de ligação do anticorpo de referência, ponto de fusão em relação a um anticorpo de referência, agregação em relação a um anticorpo de referência, nível de expressão

em relação a um anticorpo de referência ou combinações dos mesmos. Consequentemente, em uma modalidade do método da invenção, o dito método compreende ainda rastrear a dita biblioteca de variantes para determinar a ligação a um epítopo ao qual o anticorpo de referência se liga. Adequadamente, o método da invenção, pode compreender ainda rastrear a dita biblioteca de variantes para determinar um ponto de fusão, nível de expressão, nível de agregação ou estabilidade de uma variante em relação ao anticorpo de referência. Aquelas variantes determinadas se ligam ao dito epítopo com uma afinidade e/ou estabilidade/ou têm uma característica de fusão ou característica de agregação ou característica de expressão menor ou maior que um valor predeterminado em relação ao anticorpo de referência pode ser usado para gerar uma biblioteca otimizada de moléculas de anticorpo variantes. O dito método de rastreamento pode ser por meio de técnicas convencionais *in vitro*. Essas técnicas podem incluir um ensaio Elisa de afinidade, um ensaio BIAcore, um método cinético ou um método de equilíbrio/solução. Em uma alternativa, o dito rastreamento pode ser por meio de uma técnica *in silico*, usando, por exemplo, software de ancoragem molecular implementado por computador para modelar a ligação da variante ao epítopo do anticorpo de referência.

[029]Conforme mostrado nos exemplos, usando o software de ancoragem molecular, as variantes podem ser classificadas por afinidade e estabilidade previstas, permitindo a seleção de uma pequena biblioteca de variantes para síntese e expressão de DNA. Os inventores demonstraram que dentro de uma pequena biblioteca um número muito alto das variantes têm afinidade aumentada em comparação com o número que seria esperado ser identificado em uma biblioteca gerada por tecnologias existentes, como PCR propenso a erros e exibição de fago.

[030]Produtos de software de ancoragem molecular são comercialmente disponíveis. Qualquer software adequado ou ferramenta adequada para modelar a ligação do anticorpo a um epítopo pode ser usado na presente invenção. Por exemplo,

o software adequado inclui o software Bioluminate da Schrodinger, mas outros estão disponíveis.

[031]Consequentemente, em modalidades da invenção, a biblioteca de anticorpo compreende mais que 1 %, por exemplo, mais que 5 %, 10 %, 20 %, 30 %, 40 % ou 50 % de variantes com afinidade aumentada para o epítopo ligado pela referência anticorpo em comparação com a afinidade do anticorpo de referência para o dito epítopo.

[032]Em uma modalidade do método da invenção, o método é um método implementado por computador.

[033]Um quarto aspecto da invenção fornece um meio de armazenamento legível por computador compreendendo instruções para realizar um método para gerar uma biblioteca de moléculas de anticorpo variantes de acordo com o segundo aspecto da invenção.

[034]Nos métodos da invenção, sejam implementados por computador ou não, o método pode ainda compreender a etapa de sintetizar as moléculas de anticorpo variantes.

[035]Em modalidades do método da invenção, onde o método compreende um método de rastreamento implementado por computador por, por exemplo, software de modelagem de ancoragem, o método da invenção pode ainda compreender rastreamento *in vitro* da dita biblioteca de variantes para determinar a ligação a um epítopo ao qual o anticorpo de referência se liga.

[036]Um quinto aspecto da presente invenção é uma variante de um anticorpo trastuzumabe, em que a dita variante tem (i) pelo menos duas mutações de aminoácido na sequência de cadeia leve em comparação com a sequência de aminoácido de cadeia leve de um anticorpo de referência, em que o dito anticorpo de referência é trastuzumabe, (ii) pelo menos duas mutações de aminoácido na sequência de cadeia pesada em comparação com a sequência de aminoácido de

cadeia pesada de trastuzumabe, ou (iii) pelo menos uma mutação de aminoácido na sequência de cadeia leve em comparação com a sequência de aminoácido de cadeia leve de trastuzumabe e pelo menos uma mutação de aminoácido na sequência de cadeia pesada em comparação com a sequência de aminoácido de cadeia pesada de trastuzumabe; em que cada uma das ditas mutações de aminoácido está em resíduos de aminoácido independentemente codificados a partir de um segmento de DNA da sequência de DNA variante, em que o dito segmento de DNA da variante difere daquele da sequência de DNA correspondente que codifica o anticorpo de referência por uma mutação pontual em um motivo de DNA suscetível à desaminação por uma enzima indutora de hipermutação somática.

[037]Em uma modalidade do quinto aspecto da invenção, as ditas mutações de aminoácido são selecionadas a partir do grupo que consiste em lc9N, lc9T, lc9I, lc9R, lc9K, lc25G, lc25V, lc25D, lc31N, lc31S, lc31I, lc32D, lc32G, lc32V, lc32T, lc32N, lc32S, lc32I, lc32P, lc32L, lc32F, lc33L, lc33I, lc34G, lc34V, lc34D, lc38E, lc38K, lc40A, lc40S, lc40T, lc43G, lc43V, lc43T, lc43N, lc43S, lc43I, lc43P, lc43L, lc43F, lc46V, lc46I, lc47V, lc51S, lc51P, lc51T, lc76R, lc76N, lc76T, lc76K, lc76I, lc79K, lc79E, lc80T, lc80S, lc80A, lc85S, lc85N, lc85I, lc89H, lc90E, lc90A, lc91N, lc91D, lc91Y, lc93S, lc93N, lc93I, lc94S, lc94N, lc94I, lc101D, lc102S, lc102N, hc2L, hc2I, hc3H, hc4M, hc4V, hc13K, hc13E, hc14A, hc14T, hc14S, hc16A, hc16V, hc16D, hc23E, hc23G, hc23V, hc23T, hc23K, hc23R, hc23I, hc23P, hc23L, hc23S, hc24D, hc24G, hc24V, hc24T, hc24N, hc24S, hc24I, hc24P, hc24L, hc24F, hc26A, hc26V, hc26D, hc28K, hc35N, hc35D, hc35Y, hc48L, hc48I, hc49G, hc49S, hc56A, hc56V, hc56D, hc58S, hc58N, hc58I, hc61G, hc61V, hc61D, hc79G, hc79V, hc79D, hc82E, hc82K, hc85R, hc88D, hc88T, hc88S, hc88P, hc88G, hc92G, hc92V, hc92D, hc103A, hc103V,

hc103D, hc106D, hc106G, hc106V, hc106T, hc106N, hc106S, hc106I, hc106P, hc106L, hc106F, hc114S, hc114N, e hc114I.

[038]No contexto da invenção, as mutações são identificadas usando a nomenclatura acima, onde lc = cadeia leve, hc = cadeia pesada, o número se refere ao resíduo de aminoácido da cadeia e a letra maiúscula é o código de aminoácido de uma letra para a mutação de aminoácidos no dito local. Assim, por exemplo, nas alterações de aminoácidos listadas acima para o quarto aspecto, lc9N, refere-se a uma asparagina na posição 9 da cadeia leve de trastuzumabe variante.

[039]Em uma modalidade do quinto aspecto da invenção, as ditas mutações de aminoácido são selecionadas a partir do grupo que consiste em lc9T, lc9I, lc9R, lc9K, lc43F, lc47V, lc51P, lc51T, lc101D, hc2L, hc3H, hc14S, hc16V, hc24P, hc26A, hc26V, hc48I, hc58S, hc61V, hc79V, hc85R, hc88G, hc92V, hc92D, hc103A, hc103V, hc106V, hc114S, hc114N, e hc114I.

[040]Em uma modalidade do quinto aspecto, as sequências de cadeia pesada e cadeia leve variantes não diferem daquelas do anticorpo de referência em qualquer resíduo que não seja pelas mutações de aminoácido recitadas acima em relação ao quinto aspecto.

[041]Um sexto aspecto da invenção fornece uma variante de um anticorpo Catepsina S, em que a dita variante tem (i) pelo menos duas mutações de aminoácido na sequência de cadeia leve em comparação com a sequência de aminoácido de cadeia leve de um anticorpo de referência, em que o dito anticorpo de referência é Fsn503h, (ii) pelo menos duas mutações de aminoácido na sequência de cadeia pesada em comparação com a sequência de aminoácido de cadeia pesada de Fsn503h, ou (iii) pelo menos uma mutação de aminoácido na sequência de cadeia leve em comparação com a sequência de aminoácido de cadeia leve de Fsn503h e pelo menos uma mutação de aminoácido na sequência de cadeia pesada em comparação com a sequência de aminoácido de cadeia pesada de Fsn503h; em que

cada uma das ditas mutações de aminoácido está em resíduos de aminoácido independentemente codificados a partir de um segmento de DNA da sequência de DNA variante, em que o dito segmento de DNA da variante difere daquele da sequência de DNA correspondente que codifica o anticorpo de referência por uma mutação pontual em um motivo de DNA suscetível à desaminação por uma enzima indutora de hipermutação somática.

[042]Em uma modalidade do sexto aspecto da invenção, as ditas mutações de aminoácido são selecionadas a partir do grupo que consiste em lc12A, lc12S, lc12T, lc19V, lc28R, lc32T, lc32I, lc45A, lc45S, lc45T, lc50H, lc51V, lc51F, lc51I, lc56L, lc56F, lc56I, lc58K, lc66S, lc69A, lc69V, lc81T, lc81I, lc81N, lc85P, lc85S, lc85T, lc90L, lc90F, lc96I, lc96S, lc96I, lc96N, lc108N, hc3H, hc4V, hc4M, hc10A, hc10V, hc14A, hc14S, hc24G, hc24V, hc30T, hc30I, hc31R, hc31T, hc37L, hc37F, hc40P, hc40S, hc52S, hc52I, hc53S, hc53I, hc84T, hc84I, hc92G, e hc92V.

[043]Em uma modalidade do sexto aspecto da invenção, as ditas mutações de aminoácido são selecionadas a partir do grupo que consiste em grupo que consiste em lc12A, lc12S, lc12T, lc19V, lc45S, lc45T, lc50H, lc51V, lc56I, lc81I, lc96I, lc96S, lc96I, lc96N, lc108N, hc10A, hc10V, hc14S, hc30I, hc31R, hc37L, hc37F, hc40P, hc40S, hc52I, e hc92G.

[044]Em uma modalidade do sexto aspecto da invenção, as sequências de cadeia pesada e cadeia leve variantes não diferem daquelas do anticorpo de referência em qualquer resíduo que não seja pelas mutações de aminoácido recitadas acima em relação ao sexto aspecto.

[045]Em uma modalidade do quinto aspecto da invenção, a dita molécula de anticorpo variante tem a combinação de mutações de aminoácido conforme mostrado para qualquer um dos anticorpos listados na Tabelas 2 a 7. Em uma outra modalidade do quarto aspecto, a dita molécula de anticorpo variante tem a combinação de mutações de aminoácido conforme mostrado para qualquer um dos anticorpos

listados na Tabela 8. Em uma tal modalidade, o dito anticorpo variante tem a combinação de mutações de aminoácido conforme mostrado para qualquer um dos anticorpos listados na Tabela 8 e não têm quaisquer mutações de aminoácido em relação às sequências de cadeia pesada e cadeia leve de Trastuzumabe além daquelas mostradas para o dito anticorpo listado na Tabela 8.

[046]Em uma modalidade do quinto aspecto da invenção, o dito anticorpo variante tem a mutação lc43F.

[047]Em uma modalidade do quinto aspecto da invenção, o dito anticorpo variante tem a combinação de mutações de aminoácido conforme mostrado para qualquer um dos anticorpos variantes 19, 5 ou 6 na Tabela 8. Em uma tal modalidade, a dita variante não têm quaisquer mutações de aminoácido em relação às sequências de cadeia pesada e cadeia leve de Trastuzumabe além daquelas mostradas para o dito anticorpo variante na Tabela 8.

[048]Em uma modalidade do quinto aspecto da invenção, o anticorpo variante é uma variante de um anticorpo trastuzumabe compreendendo em relação ao trastuzumabe, as seguintes mutações de aminoácido: lc9K, lc43F, e hc106V. Em uma modalidade, o anticorpo variante é o anticorpo variante 19 como listado na Tabela 8.

[049]Em uma outra modalidade do quinto aspecto da invenção, o anticorpo variante é uma variante de um anticorpo trastuzumabe compreendendo em relação ao trastuzumabe, as seguintes mutações de aminoácido: lc9R, lc43F, e hc114S. Em uma modalidade, o anticorpo variante é o anticorpo variante 5 como listado na Tabela 8.

[050]Em uma outra modalidade do quinto aspecto da invenção, o anticorpo variante é uma variante de um anticorpo trastuzumabe compreendendo em relação ao trastuzumabe, as seguintes mutações de aminoácido: lc9I, lc43F,lc101D, e hc79V.

Em uma modalidade, o anticorpo variante é o anticorpo variante 6 como listado na Tabela 8.

[051]Em uma modalidade do sexto aspecto da invenção, a dita molécula de anticorpo variante tem a combinação de mutações de aminoácido conforme mostrado para qualquer um dos anticorpos listados na Tabela 1.

[052]Em certas modalidades do quinto ou sexto aspectos da invenção, as ditas sequências de cadeia pesada e cadeia leve variantes compreendem no total pelo menos três, por exemplo, pelo menos 4, pelo menos 5 ou pelo menos 6 mutações de aminoácido em comparação com a sequência de aminoácido do anticorpo de referência.

[053]Em certas modalidades do quinto ou sexto aspectos da invenção, uma ou mais das ditas mutações de aminoácido estão nas regiões estruturais do dito anticorpo variante. Em certas modalidades do quinto ou sexto aspectos da invenção, todas as ditas mutações de aminoácido estão nas regiões estruturais do dito anticorpo variante.

[054]Em certas modalidades do quinto ou sexto aspectos da invenção, uma ou mais das ditas mutações de aminoácido estão nas CDRs do dito anticorpo variante.

[055]Em certas modalidades do quinto ou sexto aspectos da invenção, a mutação de afinidade da dita molécula de anticorpo variante em relação ao anticorpo de referência é maior que -2 e a mutação de estabilidade da dita molécula de anticorpo variante em relação ao anticorpo de referência é maior que -2. Em certas modalidades do quinto ou sexto aspectos da invenção, a mutação de afinidade da dita molécula de anticorpo variante em relação ao anticorpo de referência é maior que -10, por exemplo, maior que - 15, por exemplo, maior que -20, tal como maior que -25.

[056]Em certas modalidades do quinto ou sexto aspectos da invenção, a mutação de estabilidade da dita molécula de anticorpo variante em relação ao anticorpo de referência é maior que -10, por exemplo, maior que - 30, por exemplo,

maior que -50, tal como maior que -60. Adequadamente, a característica de agregação, característica de ponto de fusão ou nível de expressão pode ser pelo menos 2 vezes, três vezes, 10 vezes diferentes do anticorpo de referência.

[057]Para evitar dúvidas, quanto maior for o valor de afinidade negativa, maior será a afinidade. Assim, um anticorpo com um valor de afinidade de -10 é considerado como tendo um valor de afinidade maior de um anticorpo com um valor de afinidade de -5. Da mesma forma, quanto maior for o valor de estabilidade negativo, maior será a estabilidade. Assim, um anticorpo com um valor de estabilidade de -10 é considerado como tendo um valor de estabilidade maior de um anticorpo com um valor de estabilidade de -5.

[058]A afinidade e a estabilidade podem ser avaliadas por qualquer método adequado. Nos exemplos, os inventores usaram a ferramenta de maturação de afinidade de varredura de resíduo como parte da ferramenta Biológica Maestro de Schrodinger. Os valores foram relativos ao anticorpo parental com o valor mínimo para afinidade melhorada considerado como sendo -2 kcal/mol para afinidade e estabilidade.

Definições

[059]A menos que definido de outra forma, todos os termos técnicos e científicos usados neste documento têm o significado comumente entendido por uma pessoa versada na técnica no campo da presente invenção.

[060]Ao longo do relatório descritivo, a menos que o contexto exija de outra forma, os termos “compreende” ou “inclui”, ou variações como “compreende” ou “compreendendo”, “inclui” ou “incluindo” serão entendidas como implicando a inclusão de um número inteiro declarado ou grupo de inteiros, mas não a exclusão de qualquer outro inteiro ou grupo de inteiros.

[061]Como usado neste documento, termos como “um”, “uma” e “o/a” incluem referentes singulares e plurais, a menos que o contexto claramente exija o contrário.

Assim, por exemplo, a referência a “um agente ativo” ou “um agente farmacologicamente ativo” inclui um único agente ativo, bem como dois ou mais agentes ativos diferentes em combinação, enquanto as referências a “um portador” incluem misturas de dois ou mais transportadores bem como um único portador e semelhantes.

[062]O termo “segmento de DNA” refere-se a uma seção de uma sequência de DNA. No contexto da presente invenção, o segmento de DNA pode ser uma seção de resíduos de DNA, sendo a dita seção parte de uma sequência de DNA mais longa que codifica uma molécula de anticorpo. O segmento de DNA pode consistir nos resíduos de DNA que formam um motivo de DNA, sendo o dito motivo de DNA um local de ligação específico de sequência para uma enzima indutora de hipermutação somática.

[063]O termo “consistindo essencialmente em”, conforme usado neste documento, significa que a invenção inclui necessariamente os itens listados e está aberta à inclusão de itens não listados que não afetam materialmente as propriedades básicas e novas da invenção.

[064]Conforme aqui definido neste documento, um “epítopo” se refere a uma pluralidade de resíduos de aminoácidos que são capazes de ser reconhecidos por, e ligados a, uma molécula de anticorpo. Os epítopos são geralmente compostos por grupos de superfície quimicamente ativos e têm características estruturais tridimensionais específicas, bem como características de carga específicas que contribuem para a estrutura tridimensional do epítopo.

[065]As moléculas de anticorpos de ou para uso na invenção podem se ligar a um epítopo não contíguo. Um “epítopo não contíguo” é um epítopo que é composto por uma série de resíduos de aminoácidos que não são lineares em alinhamento, de modo que os resíduos são espaçados ou agrupados de uma maneira não contínua ao longo do comprimento de uma sequência polipeptídica.

[066]Os termos “peptídeo”, “polipeptídeo” e “proteína” são usados aqui indistintamente para descrever uma série de pelo menos dois aminoácidos covalentemente ligados por ligações peptídicas ou ligações peptídicas modificadas, tais como isósteros. Nenhuma limitação é colocada no número máximo de aminoácidos que podem compreender um peptídeo ou proteína. Além disso, o termo polipeptídeo se estende a fragmentos, análogos e derivados de um peptídeo, em que o dito fragmento, análogo ou derivado retém a mesma atividade biológica funcional que o peptídeo do qual o fragmento, derivado ou análogo é derivado.

[067]A nomenclatura usada para descrever os constituintes de polipeptídeo neste documento segue a prática convencional em que o grupo amino (N) é apresentado à esquerda e o grupo carboxila à direita de cada resíduo de aminoácido.

Anticorpos e Moléculas de Anticorpo

[068]Um “anticorpo” é uma imunoglobulina, seja natural ou parcialmente ou totalmente produzida sinteticamente. O termo também cobre qualquer polipeptídeo, proteína ou peptídeo possuindo um domínio de ligação que é, ou é homólogo a, um domínio de ligação de anticorpo. Estes podem ser derivados de fontes naturais ou podem ser parcial ou totalmente produzidos de forma sintética. Exemplos de anticorpos são os isotipos de imunoglobulina e suas subclasses e fragmentos isotípicos que compreendem um domínio de ligação ao antígeno, como Fab, scFv, Fv, dAb ou Fd, e um anticorpo biespecífico.

[069]Como os anticorpos podem ser modificados de várias maneiras, o termo "anticorpo" e "molécula de anticorpo" deve ser interpretado como abrangendo qualquer membro de ligação ou substância com um domínio de ligação com a especificidade necessária. Uma molécula de anticorpo de e para uso na invenção pode ser um anticorpo monoclonal, ou um fragmento, derivado, equivalente funcional ou homólogo deste. O termo inclui qualquer polipeptídeo compreendendo um domínio de ligação de imunoglobulina, seja natural ou total ou parcialmente sintético.

Moléculas quiméricas compreendendo um domínio de ligação de imunoglobulina, ou equivalente, fundido a outro polipeptídeo são, portanto, incluídas.

[070]A região constante do anticorpo pode ser de qualquer subtipo de imunoglobulina adequado. Em certas modalidades, o subtipo do anticorpo pode ser da classe IgA, IgM, IgD e IgE, onde uma molécula de imunoglobulina humana é usada. Tal anticorpo pode ainda pertencer a qualquer subclasse, e. IgG1, IgG2a, IgG2b, IgG3 e IgG4.

[071]Fragmentos de um anticorpo inteiro podem desempenhar a função de ligação ao antígeno. Exemplos de tais fragmentos de ligação são um fragmento Fab compreendendo ou consistindo nos domínios de anticorpo de VL, VH, CL e CH1; um fragmento Fv que consiste nos domínios de VL e VH de um único anticorpo; um fragmento F (ab') 2; um fragmento bivalente compreendendo dois fragmentos Fab ligados; uma molécula Fv de cadeia simples (scFv), em que um domínio de VH e um domínio de VL estão ligados por um ligante de peptídeo que permite que os dois domínios se associem para formar um local de ligação ao antígeno; e um anticorpo biespecífico, que pode ser fragmentos multivalentes ou multiespecíficos construídos por fusão gênica.

[072]Em certas modalidades, podem ser usados anticorpos humanizados. Um anticorpo humanizado pode ser um anticorpo modificado possuindo a região hipervariável de um anticorpo não humano e a região constante de um anticorpo humano. Assim, o membro de ligação pode compreender uma região constante humana. A região variável diferente da região hipervariável também pode ser derivada da região variável de um anticorpo humano e/ou também pode ser derivada de um anticorpo não humano. Em outros casos, toda a região variável pode ser derivada de um anticorpo não humano e o anticorpo é considerado quimerizado.

[073]É possível tomar anticorpos monoclonais e outros e usar técnicas de tecnologia de DNA recombinante para produzir outros anticorpos ou moléculas

quiméricas que retêm a especificidade do anticorpo original. Tais técnicas podem envolver a introdução de DNA que codifica a região variável de imunoglobulina, ou as regiões determinantes de complementaridade (CDRs), de um anticorpo para as regiões constantes, ou regiões constantes mais regiões estruturais, de uma imunoglobulina diferente. Um hibridoma ou outra célula que produz um anticorpo pode estar sujeito a mutação genética ou outras alterações, que podem ou não alterar a especificidade de ligação dos anticorpos produzidos.

[074]Um anticorpo pode ser selecionado a partir do grupo que consiste em um anticorpo humano, um anticorpo humanizado, um anticorpo quimérico, um anticorpo monoclonal, um anticorpo policlonal, um anticorpo sintético, um anticorpo de camelídeo, um anticorpo de tubarão e um anticorpo *in vitro*. Em certas modalidades um fragmento de ligação com o antígeno pode ser usado. O fragmento de ligação com o antígeno pode ser derivado de qualquer um dos anticorpos anteriormente mencionados. Em certas modalidades o fragmento de ligação com o antígeno é selecionado a partir do grupo que consiste em um fragmento Fab, um fragmento scFv, um fragmento Fv e um fragmento dAb. Em certas modalidades o anticorpo compreende duas cadeias pesadas completas e duas cadeias leves completas ou um fragmento de ligação ao antígeno das mesmas. Em certas modalidades, o anticorpo é do isotipo IgG, IgA, IgE ou IgM, ou um fragmento de ligação ao antígeno do mesmo. Em certas modalidades em que o anticorpo é do isotipo IgG, o anticorpo pode ser do subtipo IgG1, IgG2 ou IgG3, ou um fragmento de ligação ao antígeno do mesmo. Em certas modalidades, o anticorpo é do subtipo IgG4 ou um fragmento de ligação ao antígeno do mesmo.

Produção de Anticorpos

[075]Os anticorpos podem ser fornecidos por uma série de técnicas. Por exemplo, uma técnica de pesquisa combinatória, tal como um ensaio de seleção biológica baseado em exibição de fago, pode ser usada para identificar sequências

de aminoácidos que têm especificidade de ligação a um antígeno. Tais técnicas de seleção biológica de exibição de fago envolvem o uso de bibliotecas de exibição de fago, que são utilizadas em métodos que identificam ligantes de ligação de epítopo adequados em um procedimento que imita a seleção imune, através da exibição de fragmentos de ligação de anticorpo na superfície de bactérias filamentosas. Os fagos com atividade de ligação específica são selecionados. O fago selecionado pode depois ser usado na produção de anticorpos quiméricos, enxertados com CDR, humanizados ou humanos. Os anticorpos podem ser testados quanto à sua capacidade de se ligarem a um antígeno usando métodos conhecidos na técnica.

[076]Os anticorpos ou fragmentos de antígeno para uso na presente invenção também podem ser gerados total ou parcialmente por síntese química. Os anticorpos podem ser facilmente preparados de acordo com métodos de síntese de peptídeos padrão bem estabelecidos, líquidos ou, de preferência, em fase sólida, cujas descrições gerais estão amplamente disponíveis e são bem conhecidas pela pessoa versada na técnica. Além disso, eles podem ser preparados em solução, pelo método da fase líquida ou por qualquer combinação de fase sólida, fase líquida e química da solução.

[077]Uma outra maneira conveniente de produzir anticorpos ou fragmentos de anticorpos adequados para uso na presente invenção é expressar ácido nucleico que os codifica pelo uso de ácido nucleico em um sistema de expressão.

[078]Os anticorpos podem ser gerados por mutagênese de genes de anticorpos para produzir repertórios artificiais de anticorpos. Esta técnica permite a preparação de bibliotecas de anticorpos. Repertórios artificiais de imunoglobulinas, tais como repertórios scFv artificiais, podem ser empregados como uma fonte de imunoglobulina a fim de identificar moléculas de ligação que têm especificidade para um epítopo específico.

[079]Os métodos para gerar repertórios são bem caracterizados na técnica.

[080]Qualquer meio adequado de geração de bibliotecas de anticorpos pode ser usado em conjunto com a presente invenção. Os protocolos de seleção para isolar os membros desejados de grandes bibliotecas são conhecidos na técnica, conforme tipificado por técnicas de exibição de fago. Tais sistemas, nos quais diversas sequências de peptídeos são exibidas na superfície do bacteriófago filamentoso, têm se mostrado úteis para a criação de bibliotecas de fragmentos de anticorpos (e as sequências de nucleotídeos que os codificam) para a seleção *in vitro* e amplificação de fragmentos de anticorpos específicos que se ligam a um antígeno alvo. As sequências de nucleotídeos que codificam as regiões de VH e VL estão ligadas a fragmentos de genes que codificam sinais líderes que os direcionam para o espaço periplasmático de *E. coli* e, como resultado, os fragmentos de anticorpos resultantes são exibidos na superfície do bacteriófago, tipicamente como fusões para proteínas de revestimento de bacteriófago (por exemplo, pIII ou pVIII). Alternativamente, os fragmentos de anticorpo são exibidos externamente em capsídeos de fago lambda (corpos de fago). Uma vantagem dos sistemas de exibição baseados em fago é que, por serem sistemas biológicos, os membros da biblioteca selecionados podem ser amplificados simplesmente pelo crescimento do fago contendo o membro da biblioteca selecionado em células bacterianas. Além disso, uma vez que a sequência de nucleotídeos que codifica o membro da biblioteca de polipeptídeos está contida em um fago ou vetor fagemídeo, o sequenciamento, a expressão e a manipulação genética subsequente são relativamente simples.

[081]Os métodos para a construção de bibliotecas de exibição de anticorpos bacteriófagos e bibliotecas de expressão de fago lambda são bem conhecidos na técnica.

[082]Um método para a produção de polipeptídeos pode compreender a cultura de células hospedeiras transformadas com um vetor de expressão recombinante que codifica um polipeptídeo sob condições que promovem a expressão

do polipeptídeo, em seguida, recuperando os polipeptídeos expressos da cultura. O versado na técnica reconhecerá que o procedimento para purificar os polipeptídeos expressos irá variar de acordo com fatores como o tipo de células hospedeiras empregadas e se o polipeptídeo é intracelular, ligado à membrana ou uma forma solúvel que é segregada da célula hospedeira.

[083]Qualquer sistema de expressão adequado pode ser empregado. Os vetores podem incluir um DNA que codifica um polipeptídeo ou fragmento da invenção, operacionalmente ligado a sequências de nucleotídeos reguladoras de transcrição ou tradução adequadas, tais como aquelas derivadas de um gene de mamífero, ave, microbiano, viral, bacteriano ou de inseto. As sequências de nucleotídeos estão operacionalmente ligadas quando a sequência reguladora se relaciona funcionalmente com a sequência de DNA. Assim, uma sequência de nucleotídeos promotores está operacionalmente ligada a uma sequência de DNA se a sequência de nucleotídeos promotores controlar a transcrição da sequência de DNA. Uma origem de replicação que confere a capacidade de se replicar nas células hospedeiras desejadas e um gene de seleção pelo qual os transformantes são identificados são geralmente incorporados ao vetor de expressão.

[084]Além disso, uma sequência que codifica um peptídeo sinal apropriado (nativo ou heterólogo) pode ser incorporada em vetores de expressão. Uma sequência de DNA para um peptídeo sinal (líder secretor) pode ser fundida na estrutura com a sequência de ácido nucleico da invenção de modo que o DNA seja inicialmente transcrito e o mRNA traduzido em uma proteína de fusão compreendendo o peptídeo sinal. Um peptídeo sinal que é funcional nas células hospedeiras pretendidas promove a secreção extracelular do polipeptídeo. O peptídeo sinal é clivado do polipeptídeo durante a tradução, mas permite a secreção do polipeptídeo pela célula.

[085]As células hospedeiras adequadas para a expressão de polipeptídeos incluem células eucarióticas superiores e levedura. Os sistemas procarióticos também são adequados.

[086]As células de mamífero e, em particular, as células CHO são particularmente preferidas para utilização como células hospedeiras. As células CHO são amplamente utilizadas na produção de proteínas devido à sua facilidade de cultura e transfectabilidade. As células ExpiCHO-S são uma linha de células em suspensão que pode crescer até densidades muito altas e permite alta expressão de proteínas. O DNA de plasmídeo de interesse pode ser transfectado em células ExpiCHO por complexação com ExpiFectamine (um reagente de transfecção catiônico à base de lipídeo) para permitir que o DNA se condense. Este DNA condensado então entra nas células ExpiCHO por endocitose e é expresso no núcleo. As proteínas expressas estão presentes no sobrenadante da cultura celular e colhidas após um número apropriado de dias.

Ácido Nucleico

[087]O ácido nucleico para utilização de acordo com a presente invenção pode compreender DNA ou RNA e pode ser total ou parcialmente sintético. Em um aspecto preferido, o ácido nucleico para utilização na invenção codifica para anticorpos ou fragmentos de anticorpos da invenção como definido acima. A pessoa versada será capaz de determinar substituições, deleções e/ou adições a tais ácidos nucleicos que ainda fornecerão uma molécula de anticorpo ou para uso na presente invenção.

[088]As sequências de ácido nucleico que codificam anticorpos ou fragmentos de anticorpos para utilização com a presente invenção podem ser prontamente preparadas pelas pessoas versadas. Estas técnicas incluem (i) a utilização da reação em cadeia da polimerase (PCR) para amplificar amostras de tal ácido nucleico, por exemplo, de fontes genômicas, (ii) síntese química, ou (iii) preparação de sequências

de cDNA. Fragmentos de anticorpo que codificam DNA podem ser gerados e usados de qualquer forma adequada conhecida pelas pessoas versadas na técnica, incluindo tomando DNA codificador, identificando locais de reconhecimento de enzimas de restrição adequados em ambos os lados da porção a ser expressa e cortando a dita porção do DNA. A porção pode então ser operacionalmente ligada a um promotor adequado em um sistema de expressão padrão disponível comercialmente. Outra abordagem recombinante é amplificar a porção relevante do DNA com iniciadores de PCR adequados. Podem ser feitas modificações nas sequências, e. usando mutagênese dirigida ao local, para levar à expressão do peptídeo modificado ou para levar em consideração as preferências de códon nas células hospedeiras usadas para expressar o ácido nucleico.

[089]O ácido nucleico pode ser compreendido como construções na forma de um plasmídeo, vetor, transcrição ou cassete de expressão que compreende pelo menos um ácido nucleico conforme descrito acima. A construção pode ser compreendida dentro de uma célula hospedeira recombinante que compreende uma ou mais construções como acima. A expressão pode ser convenientemente alcançada por cultura em condições apropriadas de células hospedeiras recombinantes contendo o ácido nucleico. Após a produção por expressão, o anticorpo ou fragmentos de anticorpo podem ser isolados e/ou purificados usando qualquer técnica adequada e, em seguida, usados conforme apropriado.

[090]Sistemas para clonagem e expressão de um polipeptídeo em uma variedade de células hospedeiras diferentes são bem conhecidos. As células hospedeiras adequadas incluem bactérias, células de mamíferos, leveduras, insetos e sistemas de baculovírus. As linhas de células de mamíferos disponíveis na técnica para a expressão de um polipeptídeo heterólogo incluem células de ovário de hamster chinês (CHO), células HeLa, células de rim de hamster bebê, células de mieloma de camundongo NS0. Um hospedeiro bacteriano comum preferido é *E. coli*. A expressão

de anticorpos e fragmentos de anticorpos em células procarióticas, como *E. coli*, está bem estabelecida na técnica. A expressão em células eucarióticas em cultura também está disponível para os versados na técnica como uma opção para a produção de um membro de ligação. As técnicas gerais para a produção de anticorpos são bem conhecidas da pessoa versada na área.

[091]Em certas modalidades da invenção, são fornecidos ácidos nucleicos recombinantes compreendendo uma inserção que codifica para um domínio variável de cadeia pesada e/ou para um domínio variável de cadeia leve de anticorpos. Por definição, tais ácidos nucléicos compreendem ácidos nucléicos de fita simples codificantes, ácidos nucléicos de fita dupla consistindo nos ditos ácidos nucléicos codificantes e de ácidos nucléicos complementares aos mesmos, ou estes próprios ácidos nucléicos complementares (único filamento).

[092]Além disso, os ácidos nucleicos que codificam um domínio variável de cadeia pesada e/ou um domínio variável de cadeia leve de anticorpos podem ser ácidos nucleicos sintetizados enzimaticamente ou quimicamente tendo a sequência autêntica que codifica para um domínio variável de cadeia pesada de ocorrência natural e/ou para a variável de cadeia leve domínio, ou um mutante deste.

Breve Descrição das Figuras

[093]As modalidades da presente invenção serão agora descritas, apenas a título de exemplo, com referência às figuras anexas, nas quais:

[094]A Figura 1 mostra sequências de aminoácido da cadeia leve e cadeia pesada do anticorpo Fsn0503h que mostram mutações potenciais acima de cada cadeia (SEQ ID Nos 1 & 2). Os aminoácidos duplamente circulados não eram permitidos na biblioteca devido ao seu uso incomum nessa posição. Asteriscos duplamente circulados (*) representam códons STOP que também não eram permitidos. As regiões de aminoácidos com um único círculo são CDRs.

[095]A Figura 2 é um modelo esquemático que mostra a interação proteína-proteína prevista entre Fsn0503h e Catepsina S.

[096]A Figura 3 mostra a Tabela 1 que lista as previsões de afinidade e estabilidade de mutações de aminoácido em uma forma combinatória para 1 a 6 mutações. Grupos de mutações destacadas em azul representam variantes tanto com estabilidade quanto com afinidade melhorada onde a mudança é maior que -2.

[097]A Figura 4 ilustra uma comparação ELISA de cada uma das variantes expressas com o anticorpo Fsn0503h parental.

[098]A Figura 5 mostra medições de afinidade (KD) de cada variante ao lado do anticorpo Fsn0503h parental, como medido por BLI com um instrumento Octet (Pall).

[099]A Figura 6 ilustra um mapa de associação-dissociação de afinidade das variantes de Fsn0503h. O anticorpo parental é mostrado como o ponto oco. A linha 4,45 nM representa afinidade igual ao anticorpo parental, e quaisquer variantes com uma afinidade aumentada (< 4,45 nM) estão dentro da área à esquerda da linha 4,45 nM.

[0100]A Figura 7 mostra sequências de aminoácido da cadeia leve do anticorpo trastuzumabe (SEQ ID NO: 3) mostrando em negrito o resíduo de aminoácido em cada posição da cadeia leve do anticorpo de tipo selvagem e, quando aplicável, nas caixas à direita de cada resíduo, mutações potenciais. Os aminoácidos mostrados com duas linhas não foram permitidos na biblioteca devido ao seu uso incomum nessa posição. Os asteriscos (*) em duas linhas representam códons STOP que também não eram permitidos. As regiões determinantes de complementaridade, CDRs e regiões estruturais (FR), são indicadas.

[0101]A Figura 8 mostra sequências de aminoácido da cadeia pesada do anticorpo trastuzumabe (SEQ ID NO: 4) mostrando em negrito o resíduo de aminoácido em cada posição da cadeia do anticorpo de tipo selvagem e, quando

aplicável, nas caixas à direita de cada resíduo , mutações potenciais. Os aminoácidos mostrados com duas linhas não foram permitidos na biblioteca devido ao seu uso incomum nessa posição. Os asteriscos (*) em duas linhas representam códons STOP que também não eram permitidos. As regiões determinantes de complementaridade, CDRs e regiões estruturais (FR), são indicadas.

[0102]A Figura 9 ilustra esquematicamente como as hipermutações somáticas podem ser usadas para causar alterações na sequência de DNA de anticorpos que resultam em mudanças de aminoácidos na estrutura da proteína do anticorpo levando a afinidade aumentada.

[0103]A Figura 10 ilustra a estrutura de cristal totalmente resolvida de trastuzumabe em complexo com HER2 humano que foi usado para realizar a varredura de resíduos. O domínio IV do domínio extracelular de HER2 foi encontrado para se ligar ao trastuzumabe.

[0104]A Figura 11a mostra a Tabela 2 que lista as variantes de trastuzumabe com uma mutação em relação ao anticorpo trastuzumabe de referência. Na coluna 2, L indica cadeia leve, enquanto H indica cadeia pesada. Δ afinidade é a mudança de energia livre prevista (ΔΔG) em kcal/mol em relação à afinidade de trastuzumabe. Δ estabilidade é a mudança prevista de energia livre (ΔΔG) em relação à estabilidade do trastuzumabe. Valores negativos de Δ afinidade e Δ estabilidade negativos são considerados para representar afinidade melhorada e estabilidade melhorada em relação ao trastuzumabe.

[0105]A Figura 11b mostra a Tabela 3 que lista as variantes de trastuzumabe com duas mutações em relação ao anticorpo trastuzumabe de referência. Na coluna 2, L indica cadeia leve, enquanto H indica cadeia pesada.

[0106]A Figura 11c mostra a Tabela 4 que lista as variantes de trastuzumabe com três mutações em relação ao anticorpo trastuzumabe de referência. Na coluna 2, L indica cadeia leve, enquanto H indica cadeia pesada.

[0107]A Figura 11d mostra a Tabela 5 que lista as variantes de trastuzumabe com quatro mutações em relação ao anticorpo trastuzumabe de referência. Na coluna 2, L indica cadeia leve, enquanto H indica cadeia pesada.

[0108]A Figura 11e mostra a Tabela 6 que lista as variantes de trastuzumabe com cinco mutações em relação ao anticorpo trastuzumabe de referência. Na coluna 2, L indica cadeia leve, enquanto H indica cadeia pesada.

[0109]A Figura 11f mostra a Tabela 7 que lista as variantes de trastuzumabe com seis mutações em relação ao anticorpo trastuzumabe de referência. Na coluna 2, L indica cadeia leve, enquanto H indica cadeia pesada.

[0110]A Figura 12 mostra a Tabela 8 que lista as 100 variantes de trastuzumabe das Tabelas 1 a 7 com afinidade melhorada e estabilidade melhorada, classificadas de acordo com a afinidade melhorada.

[0111]A Figura 13 ilustra esquematicamente as 5 principais variantes de trastuzumabe pontuadas com base na afinidade usando a mudança de energia livre prevista (ΔΔG) em kcal/mol. Na primeira e na terceira variantes classificadas, há um total de cinco mutações, enquanto as classificações 2 e 4 têm quatro mutações e, finalmente, a classificação 5 contém três mutações de aminoácidos. O domínio IV de HER2 onde o trastuzumabe se liga é ciano, enquanto o scFv é verde e as CDRs vermelhas. As mutações são destacadas em amarelo.

[0112]A Figura 14 ilustra sensorgramas de 20 amostras mostrando pontos de relatório usados para classificação. Ensaio realizado a 25 ºC.

[0113]A Figura 15 mostra um gráfico que ilustra classificação de dissociação de variantes de Trastuzumabe que se ligam a HER2 e mostra stability_early vs stability_late para identificação de ligante estável (melhores ligantes circulados em azul). No total, 89 amostras foram analisadas e classificadas em relação à estabilidade de ligação, no entanto, para maior clareza, apenas 29 são mostradas. O trastuzumabe é um material de anticorpo disponível comercialmente. Tipo selvagem é o anticorpo

possuindo a sequência de trastuzumabe e transitoriamente expresso em paralelo com todas as variantes/mutantes de trastuzumabe. Mutante é uma variante do Trastuzumabe. Os mutantes 5, 6 e 19 são variantes de trastuzumabe listadas como números 5, 6 e 19 na Tabela 8. Ensaio realizado a 25 ºC.

[0114]A Figura 16 mostra um gráfico que ilustra classificação de dissociação de variantes de Trastuzumabe que se ligam a HER2 e mostra Stability_early vs Stability_late para identificação de ligantes estáveis de um pequeno subconjunto dos ligantes superiores mostrados na Figura 15 (aqueles ligantes mais próximos da linha 100 % esquerda) No total, 14 variantes de trastuzumabe foram analisadas e classificadas em relação à estabilidade de ligação. O trastuzumabe é um anticorpo disponível comercialmente. Tipo selvagem é o material transitoriamente expresso em paralelo com todas as variantes/mutantes de Trastuzumabe. Mutante é uma variante do trastuzumabe. Os mutantes 5, 6 e 19 são variantes de trastuzumabe listadas como números 5, 6 e 19 na Tabela 8. Ensaio realizado a 37 ºC.

[0115]A Figura 17 mostra as curvas de ligação de BLI corrigidas de referência (preto), monitoradas em uma superfície de anticorpos Trastuzumabe não covalentemente imobilizado (a), tipo selvagem (b), mutante 5 (c) e (d) mutante 19, para várias concentrações de HER2 (diluído em série duas vezes; concentração mais alta mostrada na curva) a 37 ºC no tampão em execução. A constante de taxa de dissociação aparente (k_d) e as constantes de taxa de associação (k_a) foram determinadas pelo ajuste global (vermelho) de um modelo de interação 1:1 simples, A + B = AB, para os sensorgramas usando o software fornecido com o instrumento. Os resultados do ajuste global estão resumidos na Tabela 9.

[0116]A Figura 18 ilustra esquematicamente a correlação entre a previsão de afinidade e a medição para variantes de trastuzumabe.

[0117]A Figura 19 mostra curvas de ligação de BLI corrigidas em branco (preto), monitoradas em uma superfície de HER2 não covalentemente imobilizado em

uma faixa de concentrações de anticorpos do tipo selvagem (a), mutante 5 (b) e (c) mutante 19, a 37 ºC no tampão em execução. A constante de taxa de dissociação aparente (k_d) e as constantes de taxa de associação (k_a) foram determinadas pelo ajuste global (vermelho) de um modelo de interação 1:1 simples, A + B = AB, para os sensorgramas usando o software fornecido com o instrumento. Os resultados do ajuste global estão resumidos na Tabela 10.

[0118]A Figura 20 mostra curvas de ligação de BLI corrigidas de referência dupla (preto), monitoradas em uma superfície de HER2 não covalentemente imobilizado em revestido em uma faixa de concentrações, apresentadas a uma concentração de tipo selvagem (a), mutante 5 (b) e (c) anticorpos mutantes 19, a 37 ºC no tampão em execução. A constante de taxa de dissociação aparente (k_d) e as constantes de taxa de associação (k_a) foram determinadas pelo ajuste global (vermelho) de um modelo de interação 1:1 simples, A + B = AB, para os sensorgramas usando o software fornecido com o instrumento. Os resultados do ajuste global estão resumidos nas Tabelas 11, 12 e 13.

[0119]A Figura 21 exibe o rendimento de expressão de variantes Fsn0503 expressas como mg de IgG purificada por imunoensaio de Octet obtido por ml de sobrenadante CHO transfectado. Tipo selvagem mostrado em laranja.

[0120]A Figura 22 exibe os valores de determinação do ponto de fusão (TM1 e TM2) das variantes Fsn0503 em graus centrígrados. Tipo selvagem está na posição 1.

[0121]A Figura 23 mostra a medição da proporção da molécula monodispersa (não agregada) de variantes Fsn0503 por cromatografia de exclusão de tamanho. Tipo selvagem mostrado em laranja.

Exemplos

Materiais e Métodos

Projeto de Biblioteca

[0122]Uma biblioteca de anticorpos foi gerada para cada um de (i) um anticorpo anti-Catepsina S humanizado, Fsn0503h (Fusion Antibodies, Belfast) (Kwok *et al.* Molecular Cancer 2011, 10:147) e (ii) trastuzumabe (Roche), imitando o hipermutação somática natural em humanos, em busca de motivos específicos da sequência de DNA RGYW no filamento 3’ a 5’ e WRCY no filamento 5’ a 3’, reconhecido pela enzima AID, responsável por fazer mutações em anticorpos no corpo humano.

[0123]A sequência de DNA tem uma mutação pontual introduzida na guanina na posição 2 do motivo da sequência de DNA RGYW ou na citosina na posição 3 do motivo da sequência de DNA WRCY, onde o nucleotídeo é mutado para ser qualquer outro nucleotídeo. A enzima AID em humanos introduz mutações naturais nessas posições. Isso pode causar uma possível alteração no aminoácido em um único ponto. Todas essas possíveis mutações foram identificadas ao longo da sequência de DNA do anticorpo em ambas as direções nas cadeias 3’ para 5’ e 5’ para 3’ para gerar todos os aminoácidos que seriam possíveis naturalmente em toda a sequência do anticorpo para formar a biblioteca inicial.

[0124]O tamanho de cada biblioteca foi então curado removendo quaisquer responsabilidades de sequência reconhecidas, como locais de desamidação, locais de isomerização, locais de glicosilação ligada a n e locais de oxidação das sequências de aminoácidos recém-geradas.

Ancoragem Molecular

[0125]Para cada biblioteca, a ferramenta de previsão de anticorpos no Maestro 11.7 (Schrödinger) foi usada para realizar a modelagem de homologia, para gerar um modelo de anticorpo com base nas sequências de aminoácidos para as regiões de cadeia variável pesada e leve. O antígeno foi importado do PDB. No caso do Fsn0503h, os inventores importaram a estrutura cristalina da Catepsina S humana (Cat S) com uma mutação C25S com um fármaco ligado (Código do PDB: 3MPE). No

caso da biblioteca para variantes de trastuzumabe, foi usado o domínio extracelular do receptor 2 do fator de crescimento epidérmico humano (HER2) (código PDB: 1N8Z).

[0126]O assistente de preparação de proteínas (Bioluminate, Schrodinger) foi usado para atribuir ordens de ligação (usando o banco de dados do Dicionário de Componentes Químicos (CCD)), adicionar hidrogênios, criar ligações de ordem zero para metais, criar ligações de dissulfeto, converter selenometioninas em metioninas, preencher o lado ausente cadeias e loops usando Prime e gerando estados het usando Epik, para os modelos de anticorpo e antígeno. As estruturas foram posteriormente refinadas usando ProtAssign (Bioluminate, Schrodinger) para definir os estados de hidroxila, asparagina, glutamina e histidina. Águas com menos de três ligações com não-águas foram removidas. Finalmente, as estruturas foram minimizadas usando o campo de força OPLS3e. (Bioluminate, Schrödinger).

[0127]A catepsina S foi ancorada à superfície do modelo de anticorpo usando a ferramenta de ancoragem proteína-proteína, Prime. Apenas as regiões de CDR do anticorpo foram consideradas para ancoragem molecular. As regiões de não CDR foram mascaradas. Usando informações *in vitro* sobre o epítopo de Cat S, uma pose ancorada adequada foi selecionada com base na classificação e na inspeção de complementaridade de formas e interações de superfície (usando a ferramenta de análise de interação de proteínas).

[0128]Da mesma forma, para as variantes de trastuzumabe, o domínio extracelular do receptor do fator de crescimento epidérmico humano 2 (HER2) (código PDB: 1N8Z) foi ancorado à superfície do modelo de anticorpo usando a ferramenta de ancoragem de proteína-proteína, Prime. Apenas as regiões de CDR do anticorpo foram consideradas para ancoragem molecular. As regiões de não CDR foram mascaradas. Uma pose ancorada adequada foi selecionada com base na

classificação e de nossa inspeção de complementaridade de forma e interações de superfície (usando a ferramenta de análise de interação de proteína).

Análise de Mutação Combinatória

[0129]A varredura de resíduos foi realizada na posição ancorada do complexo anticorpo-antígeno. Mutações informadas foram feitas no anticorpo, evitando resíduos altamente conservados, para aumentar a afinidade do anticorpo para o antígeno e para aumentar a estabilidade.

[0130]A varredura de resíduos foi feita primeiro pela geração de modelos com uma única variação de aminoácido da estrutura original e repetida (com as mesmas mutações) para até 6 variações simultâneas do Ab de tipo selvagem. A ferramenta de mutação de resíduo calculou a estabilidade e afinidade dos mutantes em relação ao complexo antígeno-anticorpo de tipo selvagem original.

[0131]As variantes foram então classificadas por diferença na afinidade e diferença na estabilidade em relação ao tipo selvagem. Os resultados que pontuaram abaixo de um limite de -2 para diferença na estabilidade e diferença na afinidade foram selecionados e classificados com base na combinação das duas pontuações (priorizando a diferença na afinidade).

[0132]As melhores variantes do anticorpo Fsn503h e do anticorpo trastuzumabe foram sintetizadas e analisadas *in vitro*.

Síntese de Anticorpos

Transfecção transitória:

[0133]As células ExpiCHO adaptadas à suspensão foram cultivadas rotineiramente a 4 a 6 x 10^6 células/ml a 130 rpm, 37 ºC, 8 % de CO_2, em meio de expressão ExpiCHO em frascos Erlenmeyer ventilados de 500 ml. Para cada uma das variantes Fsn0503h, 1 µg/ml de DNA foi diluído em 4 % (v/v) OptiPRO SFM em um tubo de centrífuga. Em um tubo separado, 0,32 % (v/v) de ExpiFectamina foi diluída em 3,7 % de OptiPRO SFM. A mistura ExpiFectamine/OptiPRO foi então adicionada

à mistura DNA/OptiPRO e incubada à temperatura ambiente durante 3 minutos antes de adicionar 25 ml de células ExpiCHO a uma densidade final de 6 x 10^6 células/ml em frascos Erlenmeyer ventilados de 125 ml. Cada cultura transfectada foi cultivada a 37 ºC, 8 % de CO_2 e 130 rpm durante a noite. Vinte horas após a transfecção, as células foram suplementadas com 0,6 % (v/v) de intensificador ExpiCHO e 24 % (v/v) de alimentação ExpiCHO. As culturas foram então transferidas para incubadoras a 32 ºC, 5 % de CO_2 e 130 rpm. As culturas foram colhidas por centrifugação a 4000 rpm por 40 minutos a 18 ºC.

Purificação:

[0134]Duas etapas Fsn0503h WT e purificações de anticorpos variantes foram realizadas usando uma coluna Tricorn 5/50 (GE) embalada com 1 ml de MabSelect™ PrismA (GE) seguido por uma coluna de dessalinização Hitrap (Desalt) de 10 ml (2 x 5 ml) (GE). O meio de afinidade MabSelect™ PrismA foi escolhido por sua alta ligação a mAb e propriedades de especificidade e sua tolerância a álcali para limpeza eficiente no local (CIP). Todas as etapas foram realizadas à temperatura ambiente, usando uma taxa de fluxo de 4 ml/min, a menos que indicado de outra forma. Após o carregamento (realizado usando a bomba de amostra AKTA), a coluna de proteína A foi lavada (no modo de fluxo reverso) com 10 volumes de coluna (CV) de PBS seguido por uma eluição de uma etapa (no modo de fluxo reverso) com glicina 100 mM, pH 3,0. O eluato da proteína A foi coletado em um loop de 2 ml quando a absorvância estava acima de 120 mAU a 280 nm (AKTA equipado com uma célula de fluxo de 10 mm) e injetado imediatamente na coluna Desalt pré-equilibrada. O pico de eluição do Desalt foi coletado em um bloco de 2 ml de 96 poços a 2 a 8 ºC quando o eluato tinha uma absorvância acima de 100 mAU. Para evitar qualquer contaminação cruzada, o processo automatizado também incluiu uma CIP das colunas de afinidade e dessalinização. A CIP foi realizada entre cada amostra, para todas as vias de contato, usando NaOH 0,2M (modo de fluxo reverso foi usado para limpeza da coluna).

[0135]O nível de expressão foi determinado como o rendimento total do material, após purificação por ml de meio de cultura.

[0136]Variantes de trastuzumabe foram sintetizadas usando técnicas semelhantes.

Classificação de Afinidade

Ensaio de Imunoabsorção Ligado a Enzima:

[0137]As placas de 96 poços MaxiSorp foram revestidas com as sessenta e seis variantes 0503 a 1g/ml em PBS por 24 horas a 4 ºC. Para obter os resultados de EC50, as variantes foram diluídas em série de 1000 ng/ml a 1 ng/ml com PBS e revestidas em duplicado. A curva padrão foi preparada com o anticorpo parental 0503 revestido a 1 µg/ml em PBS por 24 horas a 4 ºC. Após 24 horas, as placas MaxiSorp foram lavadas três vezes com PBS-T. 200 µl de SuperBlock foram adicionados a cada poço, removidos e substituídos três vezes. 100 µl de antígeno Cat S a 200 ng/ml foram adicionados a cada poço e deixados em agitação à temperatura ambiente, 150 rpm por 1 hora e 30 minutos. As placas foram lavadas com PBS-T três vezes e secas. 100 µl de anti-his-HRP a 5 µg/ml foram adicionados a cada poço e deixados durante 1 hora e 30 minutos agitando a 150 rpm, TA. As placas foram lavadas três vezes com PBS-T, uma vez com PBS e secas. 100 µl de TMB foram adicionados a cada poço e incubados a 37 ºC por 10 minutos, que foram seguidos por 50 µl de HCL 1M e a absorbância das placas foi medida a 450 nm.

Classificação de afinidade usando o sistema de Octet RED96 (variantes Fsn503h):

[0138]Os ensaios de classificação de afinidade foram realizados capturando primeiro IgG usando biossensores Octet anti-humano (ForteBio parte nº 18-5060) seguido por uma etapa de linha de base de 2 minutos em tampão HBS-EBT (HEPES 10 mM, NaCl 150 mM, EDTA 3 mM, 1 mg/ml de BSA e 0,05% de Tween-20, pH 7,4). Os biossensores de captura de mAb foram então submersos em poços contendo 200

ng/ml de antígeno Catepsina S recombinante por 10 minutos (etapa de associação), seguido por uma etapa de dissociação de 10 min no tampão em execução. Para permitir a correção de referência dupla, os sensores capturados por IgG foram mergulhados em poços contendo apenas tampão e os sensores em branco também foram mergulhados em poços contendo o antígeno. Esta referência forneceu um meio de compensar a dissociação natural da captura de IgG e também a ligação não específica do antígeno à superfície do sensor. Todas as etapas foram realizadas a 25 ºC em tampão HBS-EBT a uma taxa de fluxo constante de 1000 rpm. Novos sensores foram usados para cada amostra. As constantes da taxa de dissociação (*k*off) foram calculadas usando o Software de análise de dados ForteBio. Todos os consumíveis utilizados foram os recomendados pela ForteBio.

Quantificação de anticorpos usando interferometria de biocamada (o sistema de Octet RED96):

[0139]Para medir o conteúdo de IgG, alíquotas de 200 µL de padrões de anticorpo (abrangendo 0,06 a 512 µg/ml) e sobrenadantes de células contendo IgG (diluídos dentro da faixa mensurável da curva de calibração) foram preparados em duplicata usando tampão HBS-EBT 1x (HEPES 10 mM, NaCl 150 mM, EDTA 3 mM, BSA 1 mg/ml e Tween-20 a 0,05 %, pH 7,4) e colocado nos poços de uma placa de microtitulação preta de 96 poços (Greiner Bio-One parte nº 655209). Todas as amostras e padrões foram medidos em duplicado usando biossensores de proteína A (Fortebio PN 18-5010). A placa foi colocada no Octet e deixada equilibrar a 25 ºC na câmara termostatizada. A execução foi iniciada colocando os sensores nos poços e medindo a mudança na espessura da camada (em nanômetros, nm) com o tempo, tudo sob controle de computador. Os dados foram coletados para cada conjunto de oito amostras por vez (uma coluna de placa é medida simultaneamente) por 180 a 600 segundos a uma taxa de fluxo de 400 a 1000 rpm (fluxo orbital). Os dados foram processados automaticamente usando o Software do Usuário Octet versão 3.1. O

tempo de medição e a taxa de fluxo foram alterados de acordo com a sensibilidade necessária.

Classificação de afinidade usando interferometria de biocamada (o sistema de Octet RED96) (variantes de trastuzumabe):

[0140]Os ensaios de classificação de afinidade foram realizados capturando primeiro *IgG usando biossensores de Octet anti-humano (ForteBio parte nº 18-5060) seguido por uma etapa de linha de base de 2 minutos em tampão HBS-P+ (HEPES 10 mM, NaCl 150 mM, 1 mg/ml de BSA e 0,05 % de Tween-20, pH 7,4). Os biossensores de captura de mAb foram então submersos em poços contendo 5 nM de antígeno HER2 (Acro Biosystems; P/N. H5225) recombinante por 15 minutos (etapa de associação), seguido por uma etapa de dissociação de 20 min no tampão de execução. Para permitir a correção de referência dupla, os sensores capturados por IgG foram mergulhados em poços contendo apenas tampão e os sensores em branco também foram mergulhados em poços contendo o antígeno. Esta referência forneceu um meio de compensar a dissociação natural da captura de IgG e também a ligação não específica do antígeno à superfície do sensor. As etapas foram realizadas a 25 ºC ou 37 ºC em tampão HBS-EBT a uma taxa de fluxo constante de 1000 rpm. Novos sensores foram usados para cada amostra. As constantes da taxa de dissociação (*k*off) foram calculadas usando o Software de análise de dados ForteBio. Todos os consumíveis utilizados foram os recomendados pela ForteBio.

* Para permitir níveis de carga semelhantes, os sobrenadantes de células contendo IgG quantificadas (conforme descrito acima) foram diluídos para uma concentração idêntica.

Determinação de K_D usando interferometria de biocamada (o sistema de Octet RED96):

[0141]Os ensaios cinéticos foram realizados capturando primeiro IgG usando biossensores Fc Octet anti-humanos seguidos de duas etapas de linha de base de 2

minutos cada no tampão em execução de tampão HBS-P+. Os biossensores de captura de mAb foram então submersos em poços contendo várias concentrações de HER2 por 15 minutos seguidos por 20 minutos de tempo de dissociação no tampão em execução. Para permitir a correção de referência dupla, os sensores capturados por IgG foram mergulhados em poços contendo apenas tampão e os sensores em branco também foram mergulhados em poços contendo a série de concentração de antígeno. Esta referência fornece um meio de compensar a dissociação natural da captura de IgG e também a ligação não específica do antígeno à superfície do sensor. Todas as etapas foram realizadas a 37 ºC em tampão cinético a uma taxa de fluxo constante de 1000 rpm.

Determinação do Ponto de Fusão

[0142]Os anticorpos comumente exibem 2 pontos de fusão mensuráveis na análise, designados TM1 e TM2 como resultado da desnaturação térmica de diferentes partes da molécula montada. Esses valores foram determinados por ensaio de deslocamento térmico. Soluções contendo 5 µl de Sypro Orange ([diluído 1/200 em PBS, pH 7,4); Molecular Probes) e 45 µl de 0,3 mg ml^{-1} de anticorpo foram adicionados a tubos de PCR de baixo perfil (Bio-Rad; TLS0851). Os tubos foram selados com tampas de vedação óticas ultraclaras (Bio-Rad; TCS0803) e aquecidos em um sistema de detecção de PCR em tempo real i-Cycler iQ5 (Bio-Rad) de 20 a 90 ºC em incrementos de 1 ºC. As alterações de fluorescência nos poços da placa foram monitoradas simultaneamente com uma câmera de carga ancorada (CCD). Os comprimentos de onda para excitação e emissão foram 485 e 575 nm, respectivamente. O ponto médio da temperatura para a transição de desdobramento da proteína, Tm, foi calculado usando o software Bio-Rad iQ5.

Determinação de monodispersidade

[0143]O nível de monodispersidade, definido como moléculas individuais livres de imunoglobulina dentro de uma preparação de anticorpo, de cada variante

também mostrou ser diferente da molécula de tipo selvagem. Esta medição é comumente usada como um indicador da propensão à agregação de moléculas de anticorpo. A agregação é a tendência das moléculas de proteína a se associarem a complexos multiméricos, diminuindo a solubilidade e a atividade de uma preparação de anticorpo ao longo do tempo e é um atributo chave que contribui para a estabilidade de uma molécula de anticorpo em solução.

[0144]Isto foi determinado nas soluções de anticorpo purificadas usando cromatografia de exclusão por tamanho. Todas as amostras foram diluídas para uma concentração final de 0,1 mg/ml usando solução salina tamponada com fosfato. Amostras altamente purificadas de anticorpos foram carregadas independentemente em uma coluna de filtração em gel Superdex 200 aumentar 10/300 GL. Amostras de 50 µl foram injetadas e a taxa de fluxo da coluna foi mantida em 0,75 µl min^{-1}. As etapas de separação e equilíbrio foram realizadas em solução salina tamponada com fosfato a 22 ºC. Os picos de proteína foram monitorados usando absorbância a 280 e 214 nm e os espectros foram analisados usando o pacote de software de emulação Unicorn (GE Healthcare). Os resultados são apresentados em V_r (ml) e área relativa do pico (%) de cada pico.

Resultados

Exemplo 1 _ Variantes de Anticorpo Catepsina S

Projeto de Biblioteca

[0145]As sequências de DNA dos domínios variáveis das cadeias leves e pesadas do anticorpo Fsn0503h foram analisadas para motivos suscetíveis à mutação durante a hipermutação somática e os resultados de aminoácidos potenciais correspondentes dessa mutação plotados acima da sequência parental, conforme mostrado na Figura 1. Qualquer aminoácidos indesejáveis ou códons STOP gerados como resultado das mutações de DNA foram identificados.

[0146]Foi uma descoberta surpreendente que existem mais mutações nas regiões estruturais do que as CDRs e, em particular, que a CDR-H3 não tem mutações funcionais.

Ancoragem Molecular

[0147]Os domínios variáveis do anticorpo Fsn0503h parental (Kwok *et al*. Molecular Cancer 2011, 10:147) foram ancorados à proteína Catepsina S usando o software de ancoragem molecular Schrödinger conforme descrito nos Métodos. O resultado do procedimento de ancoragem é mostrado na Figura 2.

Mutagênese Combinatória

[0148]Dentro das estruturas ancoradas, mutações de resíduos de aminoácidos foram introduzidas e a diferença relativa na afinidade e estabilidade prevista. As mutações foram introduzidas em números crescentes até que nenhum benefício adicional para a estabilidade ou afinidade fosse previsto. Os resultados da mutagênese combinatória são mostrados na Figura 3. Os inventores identificaram 66 variantes que tinham uma melhora prevista tanto na afinidade quanto na estabilidade. O DNA que codifica para essas variantes foi então sintetizado e os anticorpos expressos e purificados conforme descrito nos Métodos.

ELISA

[0149]Cada uma das variantes purificadas foi analisada por ELISA quanto à ligação à proteína Catepsina S recombinante. Os resultados (Figura 4) mostram que 12 das variantes têm uma OD relativa mais alta do que o Fsn0503h parental, indicando potencialmente uma afinidade mais alta para o alvo Catepsina S.

Classificação de afinidade

[0150]A fim de determinar uma comparação de afinidade precisa de cada uma das variantes com o anticorpo Fsn0503h parental, as interações com Catepsina S foram medidas por BLI usando um instrumento Octet conforme descrito nos Métodos.

[0151]Os resultados mostram que aproximadamente 50 % das variantes têm afinidade melhorada quando medida contra a leitura média para o anticorpo Fsn0503h (Figura 6). As taxas de associação (Kon) e dissociação (Kdis) são fornecidas na Figura 5.

Influência na Expressão

[0152]As 66 variantes expressas em CHO conforme descrito acima também demonstraram uma faixa de nível de expressão em relação ao tipo selvagem. O nível de IgG foi determinado por um imunoensaio de IgG humano quantitativo no instrumento BLI Octet após a purificação e expressou a quantidade total em relação ao volume do sobrenadante purificado.

Modulação do Ponto de Fusão

[0153]As 66 variantes também demonstraram uma faixa de variação nas características de estabilidade associadas às moléculas de anticorpo. Isso incluiu mudanças no perfil de temperatura de fusão em 2 pontos de fusão comumente observáveis em moléculas de imunoglobulina. Os resultados da determinação do ponto de fusão são mostrados na Figura 22. É notável que algumas variantes, como Mut 6 e Mut 49, parecem ter perdido seu padrão de fusão de duas fases distinto, com apenas uma única temperatura de fusão sendo observável.

Modulação de Monodispersidade

[0154]Esta característica foi analisada por cromatografia de exclusão de tamanho analítica das 66 variantes e mostra uma gama de valores entre as variantes analisadas, conforme apresentado na Figura 23.

Exemplo 2 - Variantes de Trastuzumabe

Projeto de Biblioteca

[0155]Uma biblioteca de variantes de anticorpos foi produzida para o trastuzumabe com base na hipermutação somática que ocorre naturalmente em humanos. Usando o método descrito acima, a hipermutação somática foi replicada,

produzindo mutações de ocorrência natural na sequência de DNA de trastuzumabe e subsequentemente traduzida em suas respectivas mutações de aminoácidos, conforme ilustrado na Figura 9. Essas mutações foram compiladas em uma biblioteca de mutações potenciais em locais específicos em ambas as regiões determinantes de complementaridade (CDRs), bem como nas regiões estruturais (Figuras 7 e 8), nas quais os resultados de aminoácidos potenciais do método são detalhados a seguir à sequência parental. Quaisquer aminoácidos indesejáveis ou códons STOP gerados como resultado das mutações de DNA foram identificados.

[0156]A estrutura cristalina totalmente resolvida de trastuzumabe em complexo com o domínio extracelular do receptor de fator de crescimento epidérmico humano 2 (HER2) (Código PDB: 1N8Z) é ilustrada na figura 10. A biblioteca de mutações de trastuzumabe ilustrada nas Figuras 7 e 8 foi usada para mutantes digitalização. Os mutantes foram varridos consecutivamente, pelo que uma única mutação de aminoácido foi primeiro analisada, seguida por duas mutações até seis mutações totais nas cadeias pesada e leve e, subsequentemente, as variantes foram classificadas com base na afinidade e estabilidade. Tal como acontece com a biblioteca Fsn503h, o software de ancoragem molecular Schrödinger foi usado conforme descrito nos Métodos.

[0157]Dentro das estruturas ancoradas, mutações de resíduos de aminoácidos foram introduzidas e a diferença relativa na afinidade e estabilidade prevista. As mutações foram introduzidas em números crescentes até que nenhum benefício adicional para a estabilidade ou afinidade fosse previsto. Os resultados da mutagênese combinatória são detalhados nas tabelas das Figuras 11 e 12. Um total de 558 variantes potenciais para trastuzumabe foram encontrados para ter afinidade melhorada e estabilidade melhorada. As cinco principais afinidades classificadas para variantes são ilustradas na Figura 13. Entre essas variantes, um total de 5 mutações nas cadeias pesadas e leves foram as mais comuns. As variantes foram pontuadas

em relação à afinidade do anticorpo parental usando a mudança de energia livre prevista (ΔΔG).

Classificação de Dissociação

[0158]Um painel de 89 variantes de Trastuzuambe foi rastreado para ligação ao antígeno HER2 usando interferometria de biocamada (ver materiais e métodos para detalhes). Sensorgramas de 20 amostras com os pontos de relatório indicados como barras de cores são mostrados na Figura 14. A Figura 15 mostra um gráfico de dispersão dos pontos de relatório plotados stability_early contra stability_late. Os melhores ligantes (14 no total), com alta estabilidade de ligação e dissociação lenta, são destacados com um círculo azul. Os experimentos de classificação fora da taxa foram repetidos para esses mutantes a 37 ºC, para fornecer dados biologicamente mais relevantes (Figura 16). O mutante 19 parecia ter maior estabilidade em comparação com o trastuzumabe WT e foi levado adiante para análise cinética.

Determinação de KD

[0159]Todas as amostras foram diluídas no tampão em execução preparado de fresco. Trastuzumabe ou uma variante (mutante) foram imobilizados na superfície de uma série de biossensores usando os métodos de captura descritos (ver materiais e métodos). HER2 foi passado sobre a superfície para gerar uma resposta de ligação. Os dados de ligação para as interações HER2 foram coletados a 37 ºC nos biossensores. Uma série de diluições do antígeno HER2 (5nM a 0,078nM) foi usada na etapa de associação, a fim de ajustar os resultados globalmente e obter os melhores valores de k_a, k_d, e K_D. Os dados de resposta para a ligação do antígeno ao IgG imobilizado na superfície foram ajustados a um modelo de ligação 1:1, produzindo os traços de dados (vermelho - ver Figura 17). Os experimentos foram realizados em duplicata e os parâmetros cinéticos médios estão resumidos na Tabela 9. Por exemplo, os dados mostram que o Mutante 19 exibe um aumento aparente de afinidade de ~ 2 vezes em comparação com o controle de tipo selvagem e

Trastuzumabe comercial. O aumento na afinidade é principalmente devido ao K_d mais lento, 6.04E-05 em comparação com 1.20E-04 para o anticorpo de tipo selvagem. A Figura 18 mostra esquematicamente uma comparação de afinidade real versus prevista para variantes de trastuzumabe selecionadas por previsões *in silico* de afinidade e estabilidade melhoradas. A classificação real de afinidade de Octet se correlaciona razoavelmente bem com as 20 principais previsões

Tabela 9: Parâmetros cinéticos (ajuste ao modelo de interação 1:1) para variantes de Trastuzumabe e interação de HER2

Nome	K_D (pM)	k_a ($m^{-1}s^{-1}$)	k_d (s^{-1})	R^2	X^2	Rmax médio
Trastuzumabe	192 ± 21	1,10E+06 ± 4,50E+04	2,12E-04 ± 3,15E-05	0,9960	0,2185	0,2112
HER2 WT	126 ± 6	1,01E+06 ± 1,85E+04	1,28E-04 ± 7,50E-06	0,9946	0,1283	0,1693
MUT 5	139 ± 5	1,05E+06 ± 5,00E+04	1,46E-04 ± 1,50E-06	0,9977	0,1395	0,2553
MUT 19	52 ± 16	1,12E+06 ± 1,30E+05	6,04E-05 ± 2,47E-05	0,9958	0,0984	0,1405

[0160]Os valores de R^2 indicam quão bem o ajuste e os dados experimentais se correlacionam e acima de 0,95 são considerados um bom ajuste; X^2 é a soma do desvio quadrado deve estar geralmente abaixo de 3 X^2 é a medida do erro entre os dados experimentais e a linha ajustada. Quanto menor o X^2 indica um melhor ajuste.

Determinação monomérica de KD

[0161]A fim de verificar ainda mais a afinidade das principais variantes e compreender a contribuição da avidez para a medição da afinidade dentro das 2 principais variantes (MUT 5 e MUT 19), essas moléculas foram preparadas por clivagem enzimática como Fragmentos de fragmentos de ligação ao antígeno (Fab), consistindo no domínio variável e no domínio constante CH1 da cadeia pesada e leve, em uma forma monomérica, com um único domínio de ligação ao antígeno por molécula.

[0162]Uma medição inicial foi feita após o revestimento das sondas com 2,5 µg/ml de proteína de fusão Fc recombinante Her2 biotinilada. Uma faixa de concentrações de cada um dos 3 anticorpos monoméricos foi avaliada quanto à ligação à superfície de Her2. Neste caso, a referência dupla não foi aplicada. Os dados do sensorgrama são mostrados na Figura 19 e os cálculos cinéticos resultantes (em um modelo 1:1) estão listados na Tabela 10.

Tabela 10: Parâmetros cinéticos (ajustados ao modelo de interação 1: 1) para variantes de Trastuzumabe como Fab monomérico e interação de HER2 a uma concentração de revestimento HER2 de 2,5 µg/ml

Anticorpo	Nível de captura (nm)	k_a ($m^{-1}s^{-1}$)	k_d (s^{-1})	K_D (M)	K_D (pM)	Estado Estacionário de K_D	R^2	X^2	R_{max} Médio
WT (4)	0,719	2,05E+06	6,17E-04	3,01E-10	300	6,40E-10	0,9513	0,141	0,059
Mut 5 (5)	0,853	1,14E+06	2,90E-04	2,56E-10	256	1,20E-10	0,9856	0,107	0,106
Mut 19 (3)	0,676	2,17E+06	1,13E-05	5,20E-12	5,2	1,00E-10	0,9848	0,0289	0,061

[0163]Os sensores foram então preparados por revestimento com 0,625, 1,25 ou 2,5 µg/ml de proteína de fusão Fc recombinante Her2 biotinilada. Os fragmentos Fab purificados foram então testados quanto à sua ligação a estas sondas. Os traços do sensorgrama são mostrados na Figura 20 para essas medições, com detalhes mostrados nas Tabelas 11, 12 e 13. Esses dados foram duplamente referenciados para excluir qualquer desvio devido a interações não específicas na superfície da sonda, ao contrário do experimento anterior.

Tabela 11: Parâmetros cinéticos (ajuste ao modelo de interação 1:1) para variantes de Trastuzumabe como Fab monomérico e interação de HER2 a uma concentração de revestimento de HER2 de 2,5 µg/ml (referência dupla)

Amostra	K_D	Erro de K_D	K_{ON}	Erro de K_{ON}	K_{OFF}	Erro de K_{OFF}	R^2	X^2	R_{MAX}
EM PESO	2,86E-10	<1,0E-12	1,18E+06	5,34E-65	3,37E-04	<1,0E-07	0,9938	0,0012	0,0921
MUT 19	1,88E-10	2,74E+56	1,19E+06	3,24E+68	2,22E-04	3,24E+62	0,9959	0,0014	0,1157
MUT 5	3,55E-10	<1,0E-12	1,29E+06	2,94E-65	4,59E-04	<1,0E-07	0,9872	0,0035	0,1138

Tabela 12: Parâmetros cinéticos (ajuste ao modelo de interação 1: 1) para variantes de Trastuzumabe como Fab monomérico e interação de HER2 em uma concentração de revestimento de HER2 de 1,25 µg/ml (referência dupla)

Amostra	K_D	Erro de K_D	K_{ON}	Erro de K_{ON}	K_{OFF}	Erro de	R^2	X^2	R_{MAX}
WT	3,12E-10	<1,0E-12	1,10E+06	1,73E-65	3,43E-04	<1,0E-07	0,9908	0,0012	0,0717
MUT 19	1,68E-10	3,79E+56	1,03E+06	3,91E+68	1,73E-04	3,91E+62	0,9914	0,0021	0,0917
MUT 5	4,50E-10	<1,0E-12	1,26E+06	2,24E-65	5,67E-04	<1,0E-07	0,9883	0,0021	0,0904

Tabela 13: Parâmetros cinéticos (ajuste ao modelo de interação 1:1) para variantes de Trastuzumabe como Fab monomérico e interação de HER2 em uma concentração de revestimento de HER2 de 0,625 µg/ml (referência dupla)

Amostra	K_D	Erro de K_D	K_{ON}	Erro de K_{ON}	K_{OFF}	Erro de K_{OFF}	R^2	X^2	R_{MAX}
EM PESO	3,15E-10	<1,0E-12	1,00E+06	1,79E-65	3,16E-04	<1,0E-07	0,9831	0,0013	0,0552
MUT 19	<1,0E-12	<1,0E-12	1,08E+06	1,94E-62	<1,0E-07	N/A	0,9894	0,0017	0,0698
MUT 5	3,40E-10	<1,0E-12	1,34E+06	2,10E-65	4,57E-04	<1,0E-07	0,9787	0,0018	0,0642

[0164]O valor de afinidade parece variar como resultado da concentração de revestimento, portanto, é difícil atribuir um valor definitivo para o aumento na afinidade para MUT 5 e MUT 19 em comparação com a molécula WT Trastuzemabe a partir dessas análises monoméricas. Sem querer se limitar à teoria, acredita-se que isso se deva ao problema de trabalhar nos limites da sensibilidade do instrumento biossensor de Octet FortéBio.

Conclusão

[0165]Usando os métodos da presente invenção, os inventores demonstraram com sucesso que a afinidade de um anticorpo para o seu alvo pode ser melhorada sem a necessidade de gerar uma biblioteca física muito grande de variantes de anticorpos e subsequente processo de seleção/triagem. Além disso, é gerado um conjunto de variantes que, após a expressão, exibem uma gama de atributos de interesse, incluindo afinidade, nível de expressão e características físico-químicas, que são todos de interesse para o potencial de desenvolvimento de uma molécula de anticorpo.

[0166]Embora a invenção tenha sido particularmente mostrada e descrita com referência a exemplos particulares, será entendido por aquelas pessoas versadas na técnica que várias mudanças na forma e detalhes podem ser feitas na mesma sem se afastar do escopo da presente invenção.

REIVINDICAÇÕES

1. Variante de um anticorpo de referência, **CARACTERIZADA** pelo fato de que a dita variante tem (i) pelo menos duas mutações de aminoácido na sequência de cadeia leve em comparação com a sequência de aminoácido de cadeia leve do anticorpo de referência, (ii) pelo menos duas mutações de aminoácido na sequência de cadeia pesada em comparação com a sequência de aminoácido de cadeia pesada do anticorpo de referência, ou (iii) pelo menos uma mutação de aminoácido na sequência de cadeia leve em comparação com a sequência de aminoácido de cadeia leve do anticorpo de referência e pelo menos uma mutação de aminoácido na sequência de cadeia pesada em comparação com a sequência de aminoácido de cadeia pesada do anticorpo de referência; em que cada uma das ditas mutações de aminoácido está em resíduos de aminoácido independentemente codificados a partir de um segmento de DNA da sequência de DNA variante, em que o dito segmento de DNA da variante difere daquele da sequência de DNA correspondente que codifica o anticorpo de referência por uma mutação pontual em um motivo de DNA suscetível à desaminação por uma enzima indutora de hipermutação somática.

2. Anticorpo variante, de acordo com a reivindicação 1, **CARACTERIZADO** pelo fato de que a dita enzima indutora de hipermutação somática é Deaminase Induzida por Ativação (AID) e o dito motivo de DNA é DGYW ou WRCH, por exemplo, RGYW ou WRCY, onde D é adenina, guanina ou timina, R é adenina ou guanina, G é guanina, C é citosina, H é adenina ou citosina ou timina, W é adenina ou timina, e Y é qualquer citosina ou timina.

3. Anticorpo variante, de acordo com a reivindicação 1 ou reivindicação 2, **CARACTERIZADO** pelo fato de que o dito anticorpo de referência é trastuzumabe.

4. Anticorpo variante, de acordo com a reivindicação 3, **CARACTERIZADO** pelo fato de que as ditas mutações de aminoácido são selecionadas a partir do grupo que consiste em lc9N, lc9T, lc9I, lc9R, lc9K, lc25G, lc25V, lc25D, lc31N, lc31S, lc31I,

lc32D, lc32G, lc32V, lc32T, lc32N, lc32S, lc32I, lc32P, lc32L, lc32F, lc33L, lc33I, lc34G, lc34V, lc34D, lc38E, lc38K, lc40A, lc40S, lc40T, lc43G, lc43V, lc43T, lc43N, lc43S, lc43I, lc43P, lc43L, lc43F, lc46V, lc46I, lc47V, lc51S, lc51P, lc51T, lc76R, lc76N, lc76T, lc76K, lc76I, lc79K, lc79E, lc80T, lc80S, lc80A, lc85S, lc85N, lc85I, lc89H, lc90E, lc90A, lc91N, lc91D, lc91Y, lc93S, lc93N, lc93I, lc94S, lc94N, lc94I, lc101D, lc102S, lc102N, hc2L, hc2I, hc3H, hc4M, hc4V, hc13K, hc13E, hc14A, hc14T, hc14S, hc16A, hc16V, hc16D, hc23E, hc23G, hc23V, hc23T, hc23K, hc23R, hc23I, hc23P, hc23L, hc23S, hc24D, hc24G, hc24V, hc24T, hc24N, hc24S, hc24I, hc24P, hc24L, hc24F, hc26A, hc26V, hc26D, hc28K, hc35N, hc35D, hc35Y, hc48L, hc48I, hc49G, hc49S, hc56A, hc56V, hc56D, hc58S, hc58N, hc58I, hc61G, hc61V, hc61D, hc79G, hc79V, hc79D, hc82E, hc82K, hc85R, hc88D, hc88T, hc88S, hc88P, hc88G, hc92G, hc92V, hc92D, hc103A, hc103V, hc103D, hc106D, hc106G, hc106V, hc106T, hc106N, hc106S, hc106I, hc106P, hc106L, hc106F, hc114S, hc114N, e hc114I.

5. Anticorpo variante, de acordo com a reivindicação 4, **CARACTERIZADO** pelo fato de que as ditas mutações de aminoácido são selecionadas a partir do grupo que consiste em lc9T, lc9I, lc9R, lc9K, lc43F, lc47V, lc51P, lc51T, lc101D, hc2L, hc3H, hc14S, hc16V, hc24P, hc26A, hc26V, hc48I, hc58S, hc61V, hc79V, hc85R, hc88G, hc92V, hc92D, hc103A, hc103V, hc106V, hc114S, hc114N, e hc114I.

6. Anticorpo variante, de acordo com qualquer uma das reivindicações 3 a 5, **CARACTERIZADO** pelo fato de que sequências de cadeia pesada e cadeia leve variantes não diferem daquelas do anticorpo de referência em qualquer resíduo que não seja pelas mutações de aminoácido recitadas na reivindicação 4.

7. Anticorpo variante, de acordo com qualquer uma das reivindicações 3 a 6, **CARACTERIZADO** pelo fato de que a dita molécula de anticorpo variante tem a combinação de mutações de aminoácido conforme mostrado para a variante número 19 da Tabela 8 ou qualquer um dos outros anticorpos listados na Tabela 8.

8. Anticorpo variante, de acordo com qualquer uma das reivindicações 3 a 6, **CARACTERIZADO** pelo fato de que a dita molécula de anticorpo variante tem a combinação de mutações de aminoácido conforme mostrado para qualquer um dos anticorpos listados nas Tabelas 2 a 7.

9. Anticorpo variante, de acordo com qualquer uma das reivindicações 3 a 8, **CARACTERIZADO** pelo fato de que o anticorpo variante é uma variante de um anticorpo trastuzumabe compreendendo em relação ao trastuzumabe, as seguintes mutações de aminoácido: lc9K, lc43F, e hc106V.

10. Anticorpo variante, de acordo com a reivindicação 1 ou reivindicação 2, **CARACTERIZADO** pelo fato de que a dita variante é uma variante de um anticorpo Catepsina S, em que o dito, em que o dito anticorpo de referência é Fsn503h.

11. Anticorpo variante, de acordo com a reivindicação 10, **CARACTERIZADO** pelo fato de que as ditas mutações de aminoácido são selecionadas a partir do grupo que consiste em lc12A, lc12S, lc12T, lc19V, lc28R, lc32T, lc32I, lc45A, lc45S, lc45T, lc50H, lc51V, lc51F, lc51I, lc56L, lc56F, lc56I, lc58K, lc66S, lc69A, lc69V, lc81T, lc81I, lc81N, lc85P, lc85S, lc85T, lc90L, lc90F, lc96I, lc96S, lc96I, lc96N, lc108N, hc3H, hc4V, hc4M, hc10A, hc10V, hc14A, hc14S, hc24G, hc24V, hc30T, hc30I, hc31R, hc31T, hc37L, hc37F, hc40P, hc40S, hc52S, hc52I, hc53S, hc53I, hc84T, hc84I, hc92G, e hc92V.

12. Anticorpo variante, de acordo com a reivindicação 11, **CARACTERIZADO** pelo fato de que as ditas mutações de aminoácido são selecionadas a partir do grupo que consiste em lc12A, lc12S, lc12T, lc19V, lc45S, lc45T, lc50H, lc51V, lc56I, lc81I, lc96I, lc96S, lc96I, lc96N, lc108N, hc10A, hc10V, hc14S, hc30I, hc31R, hc37L, hc37F, hc40P, hc40S, hc52I, e hc92G..

13. Anticorpo variante, de acordo com qualquer uma das reivindicações 10 a 12, **CARACTERIZADO** pelo fato de que as sequências de cadeia pesada e cadeia

leve variantes não diferem daquelas do anticorpo de referência em qualquer resíduo que não seja pelas mutações de aminoácido recitadas na reivindicação 11.

14. Anticorpo variante, de acordo com qualquer uma das reivindicações 10 a 13, **CARACTERIZADO** pelo fato de que a dita molécula de anticorpo variante tem a combinação de mutações de aminoácido conforme mostrado para qualquer um dos anticorpos listados na Tabela 1.

15. Anticorpo variante, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 14, **CARACTERIZADO** pelo fato de que as ditas sequências de cadeia pesada e cadeia leve variantes compreendem no total pelo menos três, por exemplo, pelo menos 4, pelo menos 5 ou pelo menos 6 mutações de aminoácido em comparação com a sequência de aminoácido do anticorpo de referência.

16. Anticorpo variante, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 15, **CARACTERIZADO** pelo fato de que uma ou mais das ditas mutações de aminoácido estão nas regiões estruturais do dito anticorpo variante.

17. Anticorpo variante, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 16, **CARACTERIZADO** pelo fato de que uma ou mais das ditas mutações de aminoácido estão nas CDRs do dito anticorpo variante.

18. Anticorpo variante, de acordo com a reivindicação 16, **CARACTERIZADO** pelo fato de que todas as ditas mutações de aminoácido estão nas regiões estruturais do dito anticorpo variante.

19. Anticorpo variante, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 18, **CARACTERIZADO** pelo fato de que a mutação de afinidade da dita molécula de anticorpo variante em relação ao anticorpo de referência é maior que -2 e a mutação de estabilidade da dita molécula de anticorpo variante em relação ao anticorpo de referência é maior que -2.

20. Biblioteca de moléculas de anticorpo, **CARACTERIZADA** pelo fato de que cada molécula de anticorpo é uma variante de um anticorpo de referência, em que a

sequência de aminoácido de cada molécula de anticorpo difere a partir da sequência de aminoácido do anticorpo de referência em um ou mais resíduos de aminoácido, em que cada um dos ditos resíduos de aminoácido são independentemente codificados a partir de um segmento de DNA da sequência de DNA variante, em que o dito segmento de DNA da variante difere daquele da sequência de DNA correspondente que codifica o anticorpo de referência por uma mutação pontual em um motivo de DNA suscetível à desaminação por uma enzima indutora de hipermutação somática.

21. Biblioteca, de acordo com a reivindicação 20, **CARACTERIZADA** pelo fato de que a dita enzima indutora de hipermutação somática é Deaminase Induzida por Ativação (AID).

22. Biblioteca, de acordo com a reivindicação 21, **CARACTERIZADA** pelo fato de que o dito motivo de DNA é DGYW ou WRCH, por exemplo, RGYW ou WRCY, onde D é adenina, guanina ou timina, R é adenina ou guanina, G é guanina, C é citosina, H é adenina ou citosina ou timina, W é adenina ou timina, e Y é qualquer citosina ou timina.

23. Biblioteca, de acordo com qualquer uma das reivindicações 20 a 22, **CARACTERIZADA** pelo fato de que a sequência de nucleotídeo que codifica cada uma das ditas moléculas de anticorpo não difere daquela do anticorpo de referência em qualquer resíduo que não seja os resíduos do dito motivo de DNA.

24. Biblioteca, de acordo com qualquer uma das reivindicações 20 a 23, **CARACTERIZADA** pelo fato de que um ou mais dos ditos motivos de DNA estão nas sequências de DNA que codificam regiões estruturais da dita molécula de anticorpo.

25. Biblioteca, de acordo com qualquer uma das reivindicações 20 a 24, **CARACTERIZADA** pelo fato de que um ou mais dos ditos motivos de DNA estão nas sequências de DNA que codificam CDRs da dita molécula de anticorpo.

26. Biblioteca, de acordo com a reivindicação 24, **CARACTERIZADA** pelo fato de que todos os ditos motivos de DNA estão nas sequências de DNA que codificam regiões estruturais da dita molécula de anticorpo.

27. Biblioteca, de acordo com qualquer uma das reivindicações 20 a 26, **CARACTERIZADA** pelo fato de que a sequência de DNA de cada variante não compreende (ou codifica) um local de desaminação, local de isomerização, local de glicosilação ligado a N ou local de oxidação que origina a partir da dita mutação pontual no dito motivo de DNA.

28. Biblioteca de sequência de nucleotídeos, **CARACTERIZADA** pelo fato de que cada membro da biblioteca codifica uma molécula de anticorpo da biblioteca de moléculas de anticorpo de acordo com qualquer uma das reivindicações 20 a 27.

29. Método para gerar/produzir uma biblioteca de moléculas de anticorpo variantes, **CARACTERIZADO** pelo fato de que as ditas moléculas de anticorpo variantes são variantes de um anticorpo de referência, o dito método compreendendo as etapas:

a) fornecer uma sequência de nucleotídeo que codifica o anticorpo de referência,

b) na dita sequência de nucleotídeo, identificar um ou mais motivos de DNA suscetível à desaminação por uma enzima indutora de hipermutação somática;

c) para um ou mais dos ditos motivos de DNA, selecionar pelo menos um resíduo de nucleotídeo variante para substituir um resíduo do dito motivo de DNA, em que a dita substituição resultará em uma sequência de nucleotídeo variante que codifica uma molécula de anticorpo variante tendo, em relação ao anticorpo de referência, uma mutação na sequência de aminoácido sendo codificada pelo dito motivo de DNA; e

d) repetir as etapas (b) e (c);

de modo que uma biblioteca contendo uma pluralidade de variantes do dito anticorpo de referência seja gerada.

30. Método, de acordo com a reivindicação 29, **CARACTERIZADO** pelo fato de que o dito método compreende ainda rastrear a dita biblioteca de variantes para determinar a ligação a um epítopo ao qual o anticorpo de referência se liga.

31. Método, de acordo com a reivindicação 30, **CARACTERIZADO** pelo fato de que aquelas variantes determinadas se ligam ao dito epítopo com uma afinidade e/ou estabilidade maior que um valor predeterminado em relação ao anticorpo de referência são usadas para gerar uma biblioteca otimizada de moléculas de anticorpo variantes.

32. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 29 a 31, **CARACTERIZADO** pelo fato de que o dito método é um método implementado por computador.

33. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 29 a 32, **CARACTERIZADO** pelo fato de que ainda compreende sintetizar as moléculas de anticorpo variantes.

34. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 29 a 33, **CARACTERIZADO** pelo fato de que a dita biblioteca é uma biblioteca de moléculas de anticorpo, de acordo com qualquer uma das reivindicações 21 a 27.

35. Biblioteca, de acordo com qualquer uma das reivindicações 20 a 27 ou método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 29 a 34, **CARACTERIZADA** pelo fato de que o anticorpo de referência é trastuzumabe ou o anticorpo anti-Catepsina S Fsn0503h.

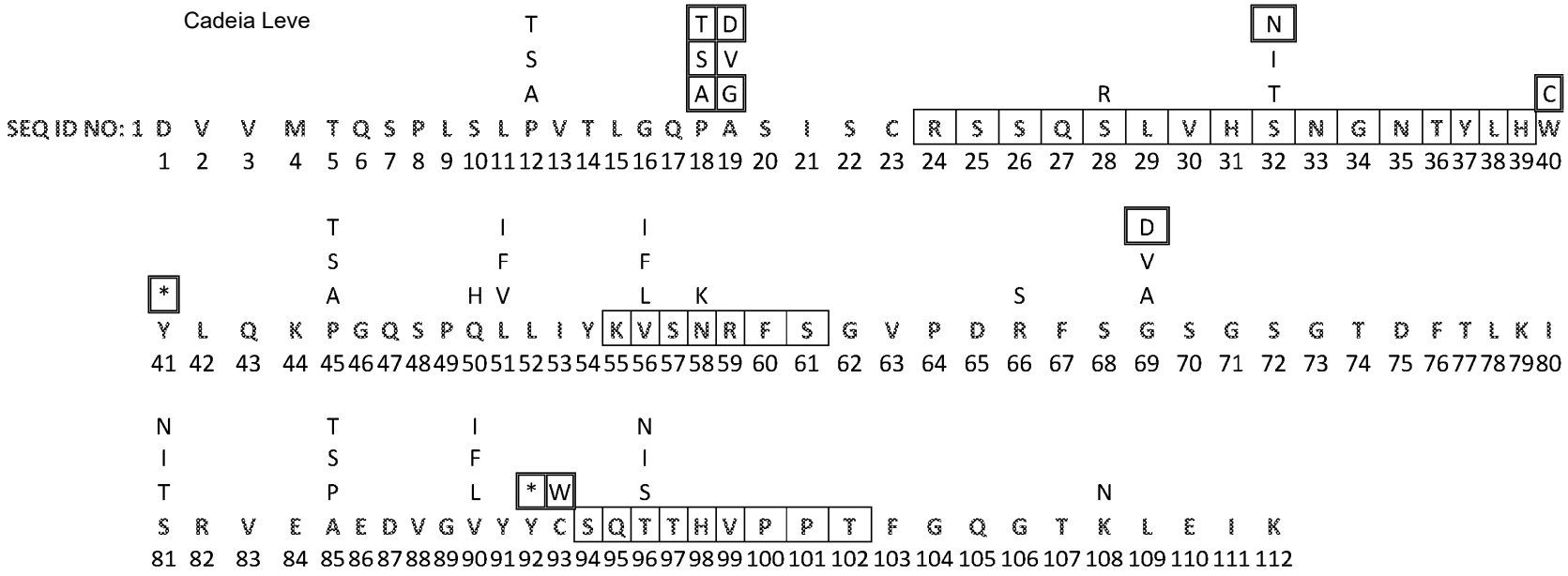

Cadeia Leve
SEQ ID NO: 1
D V V M T Q S P L S L P V T L G Q P A S I S C R S S Q S L V H S N G N T Y L H W
1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23 24 25 26 27 28 29 30 31 32 33 34 35 36 37 38 39 40
Y L Q K P G Q S P Q L L I Y K V S N R F S G V P D R F S G S G S G T D F T L K I
41 42 43 44 45 46 47 48 49 50 51 52 53 54 55 56 57 58 59 60 61 62 63 64 65 66 67 68 69 70 71 72 73 74 75 76 77 78 79 80
S R V E A E D V G V Y Y C S Q T T H V P P T F G Q G T K L E I K
81 82 83 84 85 86 87 88 89 90 91 92 93 94 95 96 97 98 99 100 101 102 103 104 105 106 107 108 109 110 111 112

Figura 1A

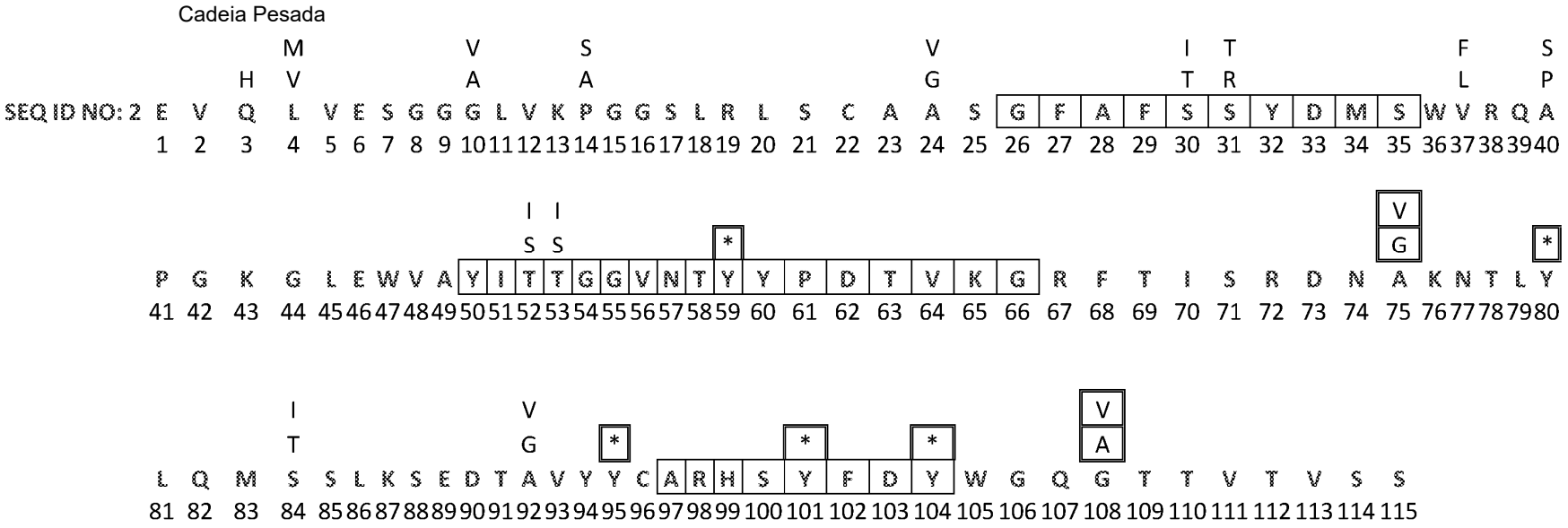

Cadeia Pesada
SEQ ID NO: 2
E V Q L V E S G G G L V K P G G S L R L S C A A S G F A F S S Y D M S W V R Q A
1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23 24 25 26 27 28 29 30 31 32 33 34 35 36 37 38 39 40
P G K G L E W V A Y I T T G G V N T Y Y P D T V K G R F T I S R D N A K N T L Y
41 42 43 44 45 46 47 48 49 50 51 52 53 54 55 56 57 58 59 60 61 62 63 64 65 66 67 68 69 70 71 72 73 74 75 76 77 78 79 80
L Q M S S L K S E D T A V Y Y C A R H S Y F D Y W G Q G T T V T V S S
81 82 83 84 85 86 87 88 89 90 91 92 93 94 95 96 97 98 99 100 101 102 103 104 105 106 107 108 109 110 111 112 113 114 115

Figura 1B

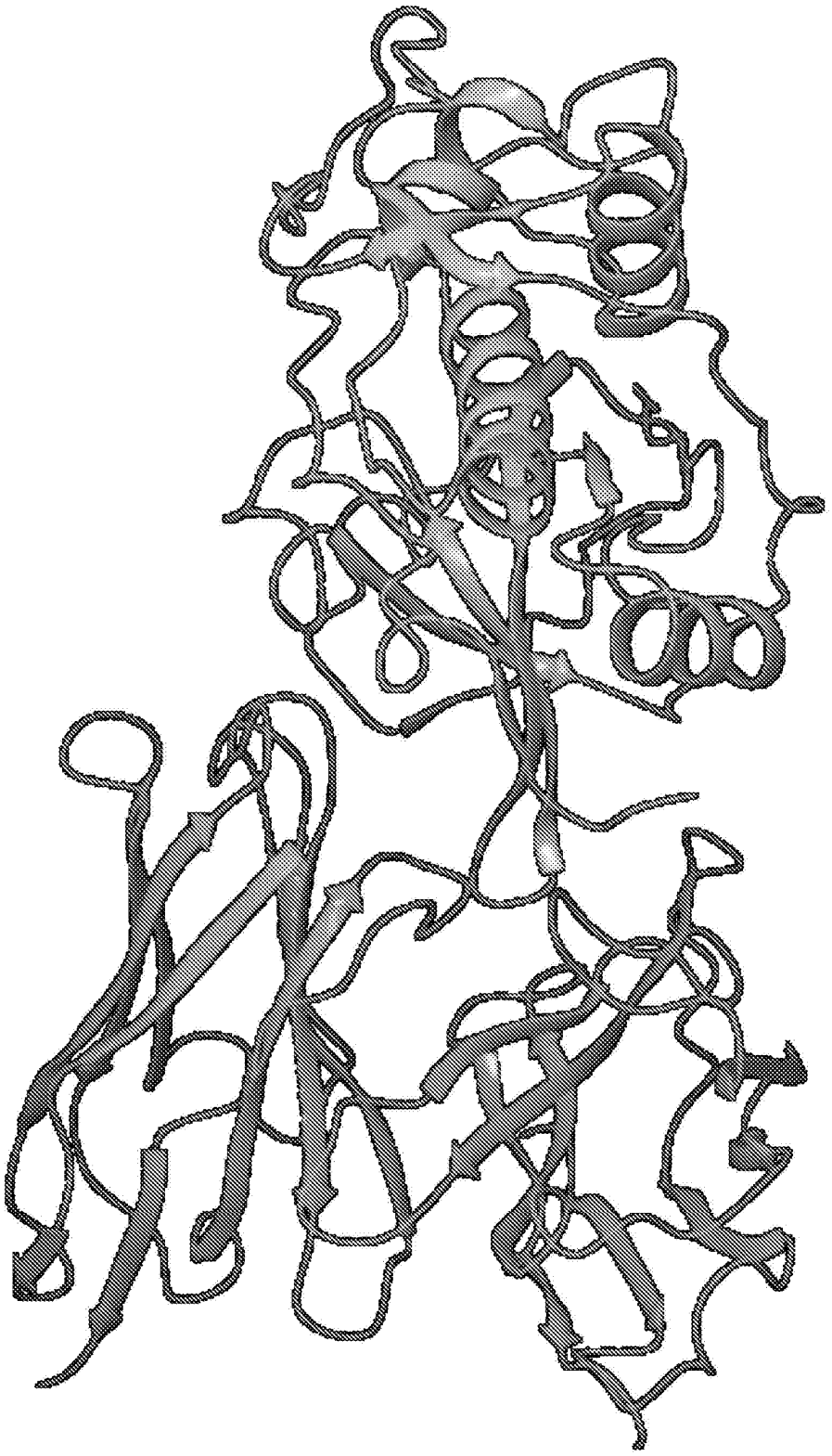


Figura 2

Figura 3

Uma Mutação					Duas Mutações				
Resíduo	Original:	Mutação	Δ Afinidade	Δ Estabilidade	Resíduo	Original:	Mutação	Δ Afinidade	Δ Estabilidade
H:31	SER	ARG	-12.49	-1	L:19	ALA	VAL	-10.68	4.62
					H:31	SER	ARG		
H:31	SER	ASN	-4.87	5.17					
H:31	SER	ILE	-4.46	-0.93					
L:96	THR	ILE	-3.16	4.48					
H:30	SER	ILE	-2.32	1.12					
H:31	SER	THR	-1.76	1.18					

Três Mutações					Quatro Mutações				
Resíduo	Original:	Mutação	Δ Afinidade	Δ Estabilidade	Resíduo	Original:	Mutação	Δ Afinidade	Δ Estabilidade
L:12	PRO	SER			L:12	PRO	SER		
H:31	SER	ARG	-9.72	0.93	L:96	THR	ILE	-16.92	-1.71
H:92	ALA	GLY			H:31	SER	ARG		
					H:52	THR	ILE		
L:12	PRO	THR							
H:31	SER	ARG	-9.72	-2.61	L:12	PRO	ALA		
H:92	ALA	GLY			L:96	THR	ILE	-15.33	-1.8
					H:31	SER	ARG		
L:12	PRO	ALA			H:52	THR	ILE		
H:31	SER	ARG	-9.72	0.84					
H:92	ALA	GLY			L:12	PRO	THR		
					L:96	THR	ILE	-15.33	-3.9
L:12	PRO	THR			H:31	SER	ARG		
H:31	SER	ASN	-4.6	2.33	H:52	THR	ILE		
H:92	ALA	GLY							
					L:12	PRO	SER		
L:12	PRO	SER			L:96	THR	ILE	-15.27	-12.76
H:31	SER	ASN	-4.48	4.5	H:30	SER	ILE		
H:92	ALA	GLY			H:31	SER	ARG		
L:12	PRO	ALA			L:12	PRO	THR		
H:31	SER	ASN	-4.48	4.41	L:96	THR	ILE	-15.26	-15
H:92	ALA	GLY			H:30	SER	ILE		
					H:31	SER	ARG		

Figura 3 (Continuação)

Três Mutações					Quatro Mutações				
Resíduo	Original:	Mutação	Δ Afinidade	Δ Estabilidade	Resíduo	Original:	Mutação	Δ Afinidade	Δ Estabilidade
					L:12	PRO	SER		
L:12	PRO	SER			L:96	THR	ASN	-15.23	3.57
H:31	SER	ILE	-3.68	4.85	H:30	SER	ILE		
H:92	ALA	GLY			H:31	SER	ARG		
L:12	PRO	THR			L:12	PRO	ALA		
H:31	SER	ILE	-3.08	1.25	L:96	THR	ASN	-15.23	3.48
H:92	ALA	GLY			H:30	SER	ILE		
					H:31	SER	ARG		
L:12	PRO	ALA							
H:31	SER	ILE	-3.08	4.75	L:12	PRO	THR		
H:92	ALA	GLY			L:96	THR	ASN	-15.23	1.38
					H:30	SER	ILE		
					H:31	SER	ARG		
L:12	PRO	THR							
L:96	THR	ILE	-13.77	-8.03	L:12	PRO	ALA		
H:31	SER	ARG			L:96	THR	ASN	-14.18	3.42
					H:30	SER	THR		
L:12	PRO	SER			H:31	SER	ARG		
H:31	THR	ARG	-13.76	-6.2					
H:52	SER	ILE							
					L:12	PRO	THR		
					L:42	LEU	ILE	-14.04	5.11
L:12	PRO	THR			L:96	THR	ASN		
H:31	SER	ARG	-13.76	-8.43	H:31	SER	ARG		
H:52	THR	ILE							
					L:12	PRO	THR		
L:12	PRO	SER			L:96	THR	SER	-14	-4.06
L:96	THR	ASN	-13.67	2.78	H:31	SER	ARG		
H:31	SER	ARG			H:52	THR	ILE		
L:12	PRO	THR			L:12	PRO	ALA		
L:96	THR	ASN	-13.67	1.98	L:50	GLN	HID	-13.83	-6.97
H:31	SER	ARG			L:96	THR	ILE		
					H:31	SER	ARG		
L:12	PRO	ALA							
H:31	SER	ARG	-13.36	4.76	L:12	PRO	ALA		
H:52	THR	ILE			L:81	SER	ILE	-13.78	-12.11
					L:96	THR	ILE		
L:12	PRO	SER			H:31	SER	ARG		
H:30	SER	ILE	-12.93	-16.98					
H:31	SER	ARG			L:12	PRO	THR		
					H:31	SER	ARG	-13.76	-5.98
					H:37	VAL	LEU		
					H:52	THR	ILE		

Figura 3 (Continuação)

Três Mutações					Quatro Mutações				
Resíduo	Original:	Mutação	Δ Afinidade	Δ Estabilidade	Resíduo	Original:	Mutação	Δ Afinidade	Δ Estabilidade
L:12	PRO	THR	-12.9	-16.3	L:12	PRO	ALA		
H:30	SER	ILE			H:31	SER	ARG	-13.76	-2.46
H:31	SER	ARG			H:37	VAL	LEU		
					H:52	THR	ILE		
L:12	PRO	ALA	-12.9	-14.14					
H:30	SER	ILE			L:12	PRO	SER		
H:31	SER	ARG			H:14	PRO	SER	-13.76	-3.52
					H:31	SER	ARG		
					H:52	THR	ILE		
					L:12	PRO	THR		
					H:14	PRO	SER	-13.75	-5.71
					H:31	SER	ARG		
					H:52	THR	ILE		
					L:12	PRO	SER		
					H:10	GLY	VAL	-13.73	-4.32
					H:31	SER	ARG		
					H:52	THR	ILE		
					L:12	PRO	SER		
					H:10	GLY	ALA	-13.73	1.16
					H:31	SER	ARG		
					H:52	THR	ILE		
					L:12	PRO	ALA		
					L:96	THR	ILE	-13.68	-12.9
					H:30	SER	ILE		
					H:31	SER	ARG		
					L:12	PRO	THR		
					L:85	ALA	SER	-13.67	2.35
					L:96	THR	ASN		
					H:31	SER	ARG		
					L:12	PRO	THR		
					L:96	THR	ASN	-13.67	-6.16
					H:31	SER	ARG		
					H:40	ALA	THR		
					L:12	PRO	SER		
					L:81	SER	THR	-13.67	3.31
					L:96	THR	ASN		
					H:31	SER	ARG		

Figura 3 (Continuação)

Três Mutações					Quatro Mutações				
Resíduo	Original:	Mutação	Δ Afinidade	Δ Estabilidade	Resíduo	Original:	Mutação	Δ Afinidade	Δ Estabilidade
					L:12	PRO	THR		
					L:81	SER	THR	-13.67	1.13
					L:96	THR	ASN		
					H:31	SER	ARG		
					L:12	PRO	SER		
					L:96	THR	ASN	-13.62	2.18
					H:30	SER	ASN		
					H:31	SER	ARG		
					L:12	PRO	ALA		
					L:96	THR	ASN	-13.62	2.1
					H:30	SER	ASN		
					H:31	SER	ARG		
					L:12	PRO	THR		
					H:31	SER	ARG	-13.59	-2.06
					H:52	VAL	ILE		
					H:83	THR	ILE		
					L:12	PRO	THR		
					L:45	PRO	SER	-13.51	5.12
					L:96	THR	ASN		
					H:31	SER	ARG		
					L:12	PRO	SER		
					L:96	THR	ASN	-13.49	1.81
					H:30	SER	THR		
					H:31	SER	ARG		
					L:12	PRO	THR		
					L:96	THR	ASN	-13.46	-0.37
					H:30	SER	THR		
					H:31	SER	ARG		
					L:12	PRO	THR		
					L:96	THR	ILE	-13.42	-1.36
					H:31	SER	ARG		
					H:92	ALA	GLY		
					L:12	PRO	SER		
					L:51	LEU	ILE	-13.41	-9.7
					H:30	SER	ILE		
					H:31	SER	ARG		

Figura 3 (Continuação)

Três Mutações					Quatro Mutações				
Resíduo	Original:	Mutação	Δ Afinidade	Δ Estabilidade	Resíduo	Original:	Mutação	Δ Afinidade	Δ Estabilidade
					L:12	PRO	THR		
					L:51	LEU	ILE	-13.41	-13.29
					H:30	SER	ILE		
					H:31	SER	ARG		
					L:12	PRO	ALA		
					L:51	LEU	ILE	-13.41	-9.79
					H:30	SER	ILE		
					H:31	SER	ARG		
					L:27	GLN	ILE		
					H:31	SER	ARG	-13.26	-2.56
					H:37	VAL	ILE		
					H:52	THR	ILE		
					L:27	GLN	THR		
					H:31	SER	ARG	-13.22	3.55
					H:37	VAL	ILE		
					H:52	THR	ILE		
					L:12	PRO	THR		
					L:51	LEU	VAL	-13.06	1.69
					L:96	THR	ILE		
					H:31	SER	ARG		
					L:12	PRO	SER		
					L:50	GLN	HID	-13.01	-15.3
					H:30	SER	ILE		
					H:31	SER	ARG		
					L:12	PRO	ALA		
					L:50	GLN	HID	-13	-15.39
					H:30	SER	ILE		
					H:31	SER	ARG		
					L:12	PRO	THR		
					L:50	GLN	HID	-12.97	-17.51
					H:30	SER	ILE		
					H:31	SER	ARG		
					L:12	PRO	THR		
					L:51	LEU	VAL	-12.95	-9.77
					H:30	SER	ILE		
					H:31	SER	ARG		

Figura 3 (Continuação)

Três Mutações					Quatro Mutações				
Resíduo	Original:	Mutação	Δ Afinidade	Δ Estabilidade	Resíduo	Original:	Mutação	Δ Afinidade	Δ Estabilidade;
					L:27	GLN	ARG		
					H:31	SER	ARG	-12.93	-2.78
					H:37	VAL	PHE		
					H:52	THR	ILE		
					L:12	PRO	SER		
					H:30	SER	ILE	-12.91	-17.22
					H:31	SER	ARG		
					H:40	ALA	SER		
					L:12	PRO	THR		
					H:30	SER	ILE	-12.91	-19.41
					H:31	SER	ARG		
					H:40	ALA	SER		
					L:12	PRO	THR		
					H:30	SER	ILE	-12.9	-24.43
					H:31	SER	ARG		
					H:40	ALA	THR		
					L:12	PRO	THR		
					L:96	THR	ASN	-12.82	-1.56
					H:30	SER	ASN		
					H:31	SER	ARG		
					L:12	PRO	SER		
					L:19	ALA	VAL	-12.8	-4.5
					H:30	SER	ILE		
					H:31	SER	ARG		
					L:12	PRO	ALA		
					H:14	PRO	THR	-12.8	-12.04
					H:30	SER	ILE		
					H:31	SER	ARG		
					L:12	PRO	THR		
					H:14	PRO	SER	-12.79	-16.44
					H:30	SER	ILE		
					H:31	SER	ARG		
					L:12	PRO	SER		
					H:14	PRO	SER	-12.79	-12.83
					H:30	SER	ILE		
					H:31	SER	ARG		

Figura 3 (Continuação)

Três Mutações					Quatro Mutações				
Resíduo	Original:	Mutação	Δ Afinidade	Δ Estabilidade	Resíduo	Original:	Mutação	Δ Afinidade	Δ Estabilidade
					L:12	PRO	THR		
					H:14	PRO	THR	-12.79	-14.14
					H:30	SER	ILE		
					H:31	SER	ARG		
					L:12	PRO	ALA		
					H:14	PRO	SER	-12.79	-12.93
					H:30	SER	ILE		
					H:31	SER	ARG		
					L:12	PRO	SER		
					H:14	PRO	SER	-12.79	-11.2
					H:30	SER	ILE		
					H:31	SER	ARG		
					L:12	PRO	THR		
					L:45	PRO	SER	-12.78	-13.38
					H:30	SER	ILE		
					H:31	SER	ARG		
					L:12	PRO	THR		
					L:45	PRO	THR	-12.78	-15.1
					H:30	SER	ILE		
					H:31	SER	ARG		
					L:12	PRO	THR		
					L:108	LYS	ASN	-12.76	-15.47
					H:30	SER	ARG		
					H:31	SER	ASP		
					L:12	PRO	THR		
					L:56	VAL	ILE	-12.74	-15.73
					H:30	SER	ILE		
					H:31	SER	ARG		
					L:12	PRO	ALA		
					L:45	PRO	SER	-12.69	-7.41
					L:96	THR	ILE		
					H:31	SER	ARG		
					L:12	PRO	SER		
					L:108	LYS	ASN	-12.69	-15.77
					H:30	SER	ILE		
					H:31	SER	ARG		

Figura 3 (Continuação)

Cinco Mutações						Seis Mutações				
Resíduo	Original	Mutação	Δ Afinidade	Δ Estabilidade		Resíduo	Original	Mutação	Δ Afinidade	Δ Estabilidade
L:12	PRO	SER				L:12	PRO	SER		
H:30	SER	ASN				L:96	THR	ASN		
H:31	SER	ARG	-16.07	4.91		H:30	SER	ILE	-17.69	5.29
H:52	THR	ILE				H:31	SER	ARG		
H:92	ALA	GLY				H:40	ALA	THR		
						H:52	THR	ILE		
L:12	PRO	THR								
L:27	GLN	THR				L:12	PRO	THR		
H:31	SER	ARG	-13.9	2.53		L:96	THR	ASN		
H:52	THR	ILE				H:30	SER	ILE	-17.69	3.1
H:92	ALA	GLY				H:31	SER	ARG		
						H:40	ALA	THR		
L:12	PRO	SER				H:52	THR	ILE		
L:81	SER	THR								
H:31	SER	ARG	-13.8	2.46		L:12	PRO	ALA		
H:52	THR	ILE				L:51	LEU	VAL		
H:92	ALA	GLY				H:30	SER	ILE	-16.11	0.88
						H:31	SER	ARG		
L:12	PRO	SER				H:40	ALA	SER		
L:45	PRO	THR				H:52	THR	ILE		
H:31	SER	ARG	-13.8	4.36						
H:52	THR	ILE				L:23	PRO	THR		
H:92	ALA	GLY				L:51	LEU	VAL		
						H:30	SER	ILE	-16.1	-1.19
L:12	PRO	SER				H:31	SER	ARG		
L:96	THR	ILE				H:40	ALA	SER		
H:30	SER	ILE	-13.52	-6.31		H:52	THR	ILE		
H:31	SER	ARG								
H:92	ALA	GLY				L:12	PRO	SER		
						L:96	THR	ASN		
L:12	PRO	ALA				H:30	SER	ASN	-16.05	4.11
L:96	THR	ILE				H:31	SER	ARG		
H:30	SER	ILE	-13.52	-6.4		H:40	ALA	THR		
H:31	SER	ARG				H:52	THR	ILE		
H:92	ALA	GLY								
						L:12	PRO	ALA		
L:12	PRO	SER				H:10	GLY	ALA		
H:30	SER	ILE				H:30	SER	ILE	-15.37	-7.41
H:31	SER	ARG	-15.44	-8.88		H:31	SER	ARG		
H:40	ALA	SER				H:40	ALA	SER		
H:52	THR	ILE				H:52	THR	ILE		

Figura 3 (Continuação)

Cinco Mutações					Seis Mutações				
Resíduo	Original	Mutação	Δ Afinidade	Δ Estabilidade	Resíduo	Original	Mutação	Δ Afinidade	Δ Estabilidade
L:12	PRO	THR			L:12	PRO	SER		
H:30	SER	ILE			H:30	SER	ILE		
H:31	SER	ARG	-15.28	-16.01	H:31	SER	ARG	-15.36	2.08
H:40	ALA	THR			H:40	ALA	SER		
H:52	THR	ILE			H:52	THR	ILE		
					H:83	MET	ILE		
L:12	PRO	SER							
L:96	THR	ILE			L:12	PRO	THR		
H:31	SER	ARG	-15.27	-10.16	H:30	SER	ILE		
H:40	ALA	THR			H:31	SER	ARG	-15.36	-0.1
H:52	THR	ILE			H:40	ALA	SER		
					H:52	THR	ILE		
L:12	PRO	SER			H:83	MET	ILE		
H:30	SER	ILE							
H:31	SER	ARG	-15.26	-13.79	L:12	PRO	ALA		
H:40	ALA	THR			H:10	GLY	ALA		
H:52	THR	ILE			H:30	SER	ILE	-15.36	-12.36
					H:31	SER	ARG		
L:12	PRO	ALA			H:40	ALA	THR		
H:30	SER	ILE			H:52	THR	ILE		
H:31	SER	ARG	-15.25	-8.79					
H:40	ALA	PRO			L:12	PRO	SER		
H:52	THR	ILE			H:10	GLY	ALA		
					H:30	SER	ILE	-15.36	-7.31
					H:31	SER	ARG		
					H:40	ALA	SER		
					H:52	THR	ILE		
					L:12	PRO	SER		
					H:10	GLY	VAL		
					H:30	SER	ILE	-15.36	-7.14
					H:31	SER	ARG		
					H:40	ALA	SER		
					H:52	THR	ILE		
					L:12	PRO	SER		
					L:45	PRO	ALA		
					H:30	SER	ILE	-15.35	-5.15
					H:31	SER	ARG		
					H:40	ALA	SER		
					H:52	THR	ILE		

Figura 3 (Continuação)

Cinco Mutações						Seis Mutações				
Resíduo	Original	Mutação	Δ Afinidade	Δ Estabilidade		Resíduo	Original	Mutação	Δ Afinidade	Δ Estabilidade
						L:12	PRO	SER		
						H:10	GLY	ALA		
						H:30	SER	ILE	-15.35	-12.26
						H:31	SER	ARG		
						H:40	ALA	THR		
						H:52	THR	ILE		
						L:12	PRO	ALA		
						H:30	SER	ILE		
						H:31	SER	ARG	-15.34	2.01
						H:40	ALA	SER		
						H:52	THR	ILE		
						H:83	MET	ILE		
						L:12	PRO	SER		
						H:30	SER	ILE		
						H:31	SER	ARG	-15.32	-2.58
						H:40	ALA	SER		
						H:52	THR	ILE		
						H:92	ALA	GLY		
						L:12	PRO	THR		
						L:27	GLN	ILE		
						H:30	SE5R	ILE	-15.31	-12.88
						H:31	SER	ARG		
						H:40	ALA	SER		
						H:52	THR	ILE		
						L:12	PRO	THR		
						L:27	GLN	ILE		
						H:30	SER	ILE	-15.31	4.6
						H:31	SER	ARG		
						H:40	ALA	PRO		
						H:52	THR	ILE		
						L:12	PRO	THR		
						L:27	GLN	ILE		
						H:30	SER	ILE	-15.3	-17.85
						H:31	SER	ARG		
						H:40	ALA	THR		
						H:52	THR	ILE		

Figura 3 (Continuação)

Cinco Mutações						Seis Mutações				
Resíduo	Original	Mutação	Δ Afinidade	Δ Estabilidade		Resíduo	Original	Mutação	Δ Afinidade	Δ Estabilidade
						L:12	PRO	SER		
						L:96	THR	ILE		
						H:10	GLY	VAL	-15.27	-3.35
						H:31	SER	ARG		
						H:40	ALA	SER		
						H:52	THR	ILE		
						L:12	PRO	SER		
						L:96	SER	ILE		
						H:10	THR	ILE	-15.26	-15.43
						H:31	SER	ARG		
						H:40	ALA	THR		
						H:52	THR	ILE		
						L:12	PRO	SER		
						L:96	THR	ILE		
						H:10	GLY	VAL	-15.26	-8.31
						H:31	SER	ARG		
						H:40	ALA	THR		
						H:52	THR	ILE		
						L:12	PRO	ALA		
						H:10	GLY	VAL		
						H:30	SER	ILE	-15.25	-7
						H:31	SER	ARG		
						H:40	ALA	SER		
						H:52	THR	ILE		
						L:12	PRO	THR		
						L:81	SER	THR		
						H:30	SER	ILE	-15.25	-10.28
						H:31	SER	ARG		
						H:40	ALA	SER		
						H:52	THR	ILE		
						L:12	PRO	THR		
						L:108	LYS	ASN		
						H:30	SER	ILE	-15.14	-11.18
						H:31	SER	ARG		
						H:40	ALA	SER		
						H:52	THR	ILE		

Figura 3 (Continuação)

Cinco Mutações						Seis Mutações				
Resíduo	Original	Mutação	Δ Afinidade	Δ Estabilidade		Resíduo	Original	Mutação	Δ Afinidade	Δ Estabilidade
						L:12	PRO	SER		
						L:51	LEU	VAL		
						H:30	SER	THR	-15.07	1.04
						H:31	SER	ARG		
						H:40	ALA	SER		
						H:52	THR	ILE		
						L:12	PRO	THR		
						L:51	LEU	VAL		
						H:30	SER	THR	-15.07	-1.15
						H:31	SER	ARG		
						H:40	ALA	SER		
						H:52	THR	ILE		

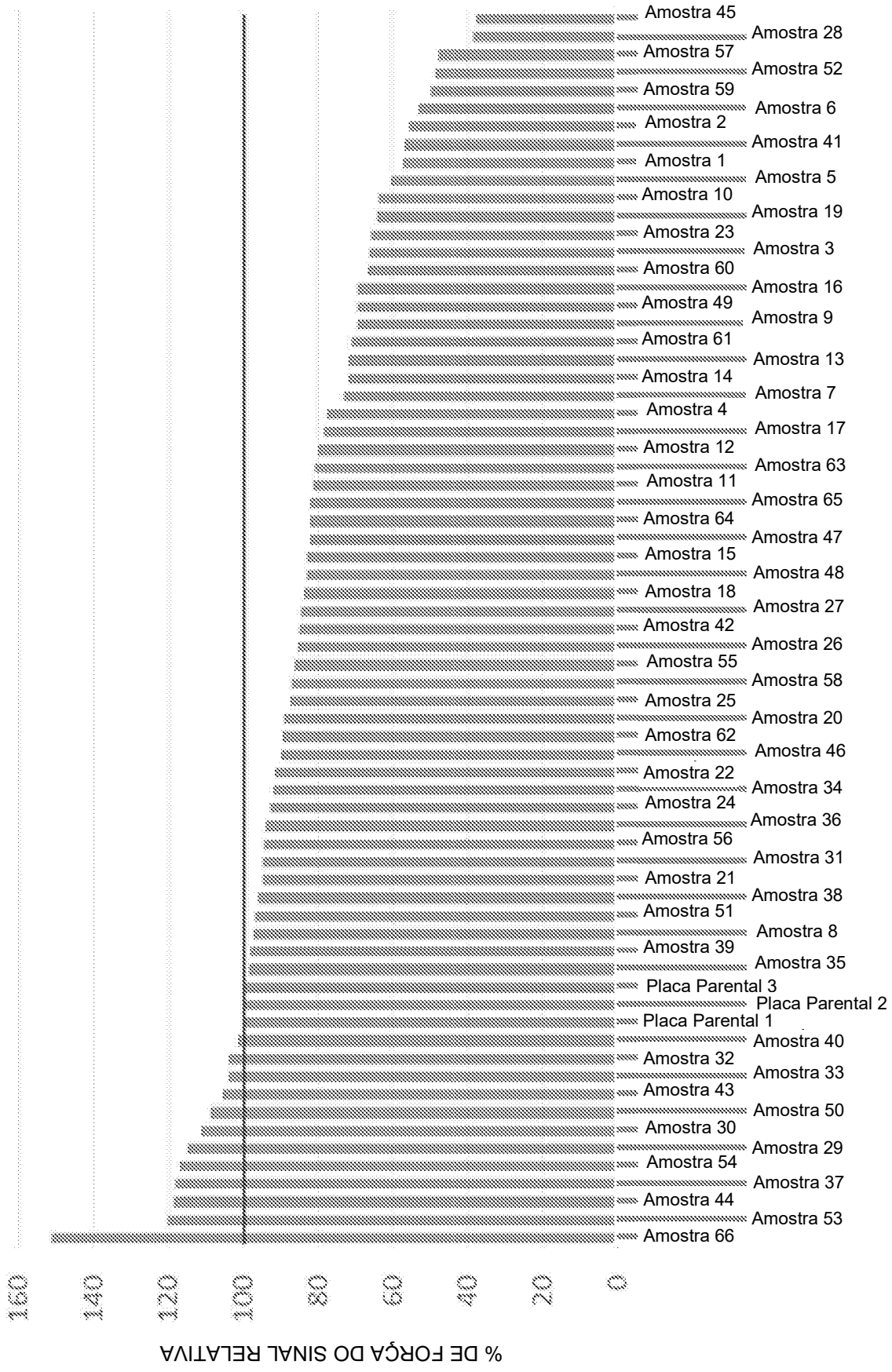

Amostra 45
Amostra 28
Amostra 57
Amostra 52
Amostra 59
Amostra 6
Amostra 2
Amostra 41
Amostra 1
Amostra 5
Amostra 10
Amostra 19
Amostra 23
Amostra 3
Amostra 60
Amostra 16
Amostra 49
Amostra 9
Amostra 61
Amostra 13
Amostra 14
Amostra 7
Amostra 4
Amostra 17
Amostra 12
Amostra 63
Amostra 11
Amostra 65
Amostra 64
Amostra 47
Amostra 15
Amostra 48
Amostra 18
Amostra 27
Amostra 42
Amostra 26
Amostra 55
Amostra 58
Amostra 25
Amostra 20
Amostra 62
Amostra 46
Amostra 22
Amostra 34
Amostra 24
Amostra 36
Amostra 56
Amostra 31
Amostra 21
Amostra 38
Amostra 51
Amostra 8
Amostra 39
Amostra 35
Placa Parental 3
Placa Parental 2
Placa Parental 1
Amostra 40
Amostra 32
Amostra 33
Amostra 43
Amostra 50
Amostra 30
Amostra 29
Amostra 54
Amostra 37
Amostra 44
Amostra 53
Amostra 66
160
140
120
100
80
60
40
20
0
% DE FORÇA DO SINAL RELATIVA

Figura 4

Figura 5

	ID da Amostra	KD (M)	kon (1/Ms)	kdis (1/s)
Execução 1	Fsn0503h	3.05E-09	3.96E+04	1.21E-04
	WT	*<1.0E-12*	4.51E+04	<1.0E-07
	Mut 1	3.63E-09	3.77E+04	1.37E-04
	Mut 2	*<1.0E-12*	2.02E+05	<1.0E-07
	Mut 3	*<1.0E-12*	8.72E+04	<1.0E-07
	Mut 4	*<1.0E-12*	2.96E+04	<1.0E-07
	Mut 5	**1.40E-09**	2.84E+04	3.99E-05
	Mut 6	1.75E-08	4.17E+04	7.31E-04
	Mut 7	4.88E-09	3.70E+04	1.80E-04
	Mut 8	7.69E-09	3.13E+04	2.41E-04
	Mut 9	5.66E-09	5.73E+04	2.11E-04
	Mut 10	8.01E-09	1.68E+04	1.34E-04
	Mut 11	*<1.0E-12*	4.28E+04	<1.0E-07
	Mut 12	8.42E-09	2.71E+04	2.28E-04
	Mut 13	7.31E-09	3.96E+04	2.89E-04
	Mut 14	7.28E-09	3.75E+04	2.73E-04
	Mut 15	6.04E-09	2.99E+04	1.80E-04
	Mut 16	6.24E-09	3.77E+04	2.35E-04
	Mut 17	3.10E-09	3.06E+04	1.13E-04
	Mut 18	5.03E-09	2.07E+04	1.04E-04
	Mut 19	*<1.0E-12*	1.78E+04	<1.0E-07

	ID da Amostra	KD (M)	kon (1/Ms)	kdis (1/s)
	Mut 20	**3.54E-10**	3.67E+04	1.30E-05
	Mut 21	3.10E-09	3.16E+04	9.80E-05
	Mut 22	4.55E-09	4.28E+04	1.95E-04
	Mut 23	1.20E-08	2.53E+04	3.04E-04
	Mut 24	1.48E-09	3.68E+04	5.44E-05
	Mut 25	2.81E-09	3.83E+04	1.07E-04
	Mut 26	*<1.0E-12*	1.17E+05	<1.0E-07
	Mut 27	*<1.0E-12*	8.78E+04	<1.0E-07
	Mut 29	4.78E-09	3.35E+04	1.60E-04
	Mut 30	**2.80E-09**	3.80E+04	1.06E-04
	Mut 31	5.33E-09	2.98E+04	1.59E-04
	Mut 32	4.48E-09	4.27E+04	1.91E-04
	Mut 33	3.13E-09	3.79E+04	1.18E-04
	Mut 34	7.39E-09	3.99E+04	2.95E-04
	Mut 35	6.82E-09	2.64E+04	1.80E-04
	Mut 36	*<1.0E-12*	2.04E+05	<1.0E-07
	Mut 37	5.53E-09	3.40E+04	1.88E-04
	Mut 38	3.10E-09	4.34E+04	1.34E-04
	Mut 39	3.92E-09	3.89E+04	1.52E-04
	Mut 40	**3.03E-09**	3.81E+04	1.15E-04

	ID da Amostra	KD (M)	kon (1/Ms)	kdis (1/s)
Execução 1	Mut 41	3.34E-09	2.72E+04	9.07E-05
	Mut 42	4.40E-09	4.11E+04	1.81E-04
	Mut 43	6.31E-09	1.93E+04	1.22E-04
	Mut 44	*<1.0E-12*	1.82E+05	<1.0E-07
	Mut 45	**1.56E-09**	1.74E+04	2.72E-05
	Mut 46	6.33E-09	1.84E+04	1.17E-04
	Mut 47	**2.55E-09**	1.22E+04	3.12E-05
	Mut 48	3.14E-09	2.09E+04	6.56E-05
	Mut 49	1.77E-08	2.38E+04	4.21E-04
	Mut 50	6.59E-09	1.96E+04	1.29E-04
	Mut 51	9.01E-09	3.73E+04	3.36E-04
	Mut 52	1.80E-08	2.21E+04	3.99E-04
	Fsn0503h	5.47E-09	2.62E+04	1.44E-04
	Sem hIgG	*<1.0E-12*	2.52E+05	<1.0E-07

	ID da Amostra	KD (M)	kon (1/Ms)	kdis (1/s)
Execução 2	Fsn0503h	4.39E-09	4.28E+04	1.88E-04
	Mut 53	**4.04E-09**	3.83E+04	1.55E-04
	Mut 54	*<1.0E-12*	1.08E+05	<1.0E-07
	Mut 55	*<1.0E-12*	1.10E+05	<1.0E-07
	Mut 56	5.14E-09	4.02E+04	2.07E-04
	Mut 57	**4.49E-10**	3.79E+04	1.70E-05
	Mut 58	5.37E-09	1.69E+04	9.07E-05
	Mut 59	9.21E-09	1.87E+04	1.72E-04
	Mut 60	**2.89E-09**	2.33E+04	6.72E-05
	Mut 61	4.12E-08	3.15E+04	1.30E-03
	Mut 62	2.63E-08	1.16E+04	3.05E-04
	Mut 63	1.24E-08	1.27E+04	1.58E-04
	Mut 64	**2.78E-09**	3.57E+04	9.94E-05
	Mut 65	**2.63E-09**	1.50E+04	3.96E-05
	Mut 66	**2.31E-09**	3.44E+04	7.94E-05
	Fsn0503h	5.11E-09	4.73E-04	2.42E-04
	Sem hIgG	1.91E-08	1.81E+05	3.45E-03
	Sem hIgG	*<1.0E-12*	1.00E+05	<1.0E-07

Negrito = Afinidade maior do que a melhor leitura para Fsn0503h

Sublinhado = Controle de Fsn0503h

Itálico = Afinidade a ser determinada

Figura 6

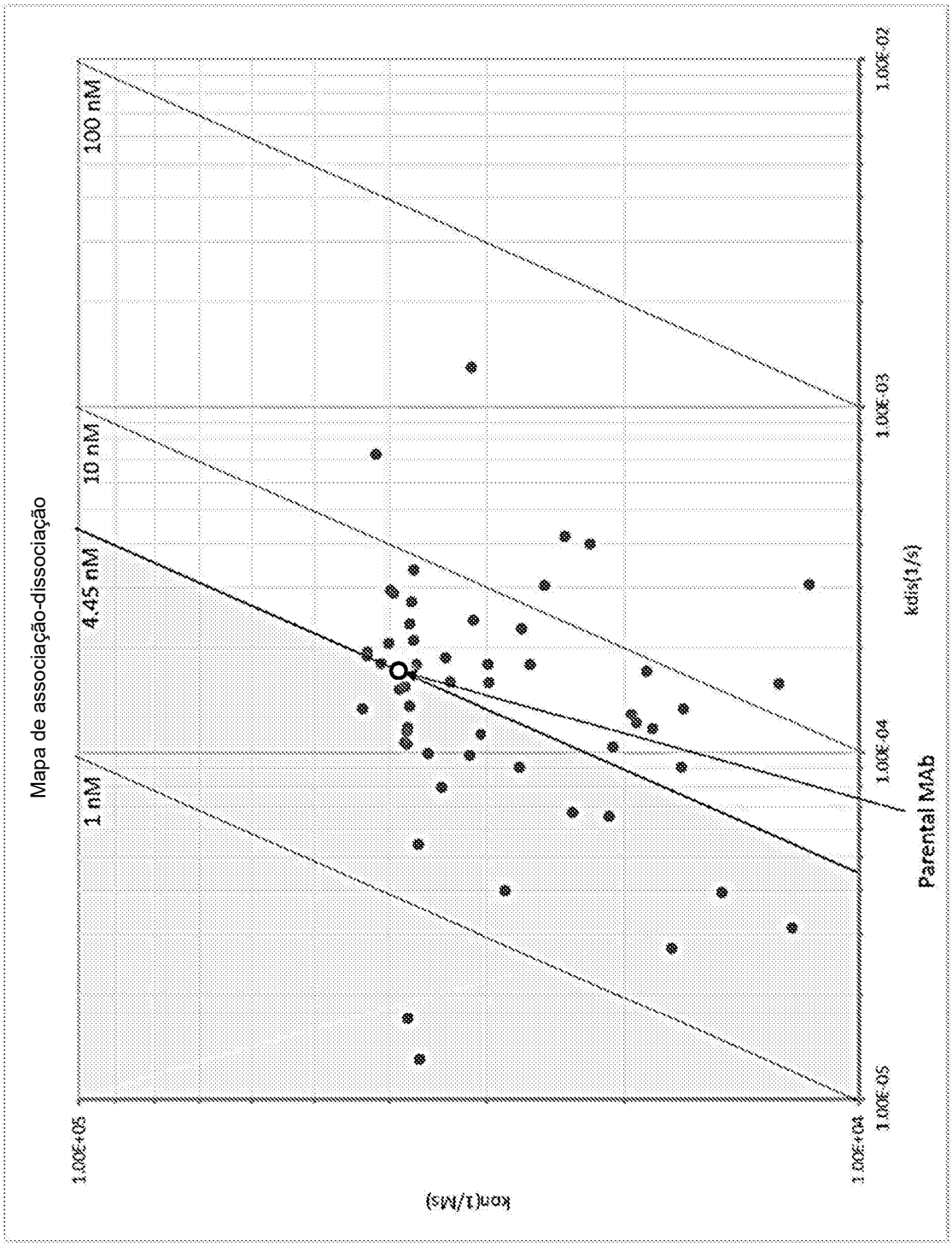

Mapa de associação-dissociação
100 nM
10 nM
4.45 nM
1 nM
1.00E-02
1.00E-03
1.00E-04
1.00E-05
kdis(1/s)
1.00E+05
1.00E+04
kon(1/Ms)
Parental MAb

Figura 7

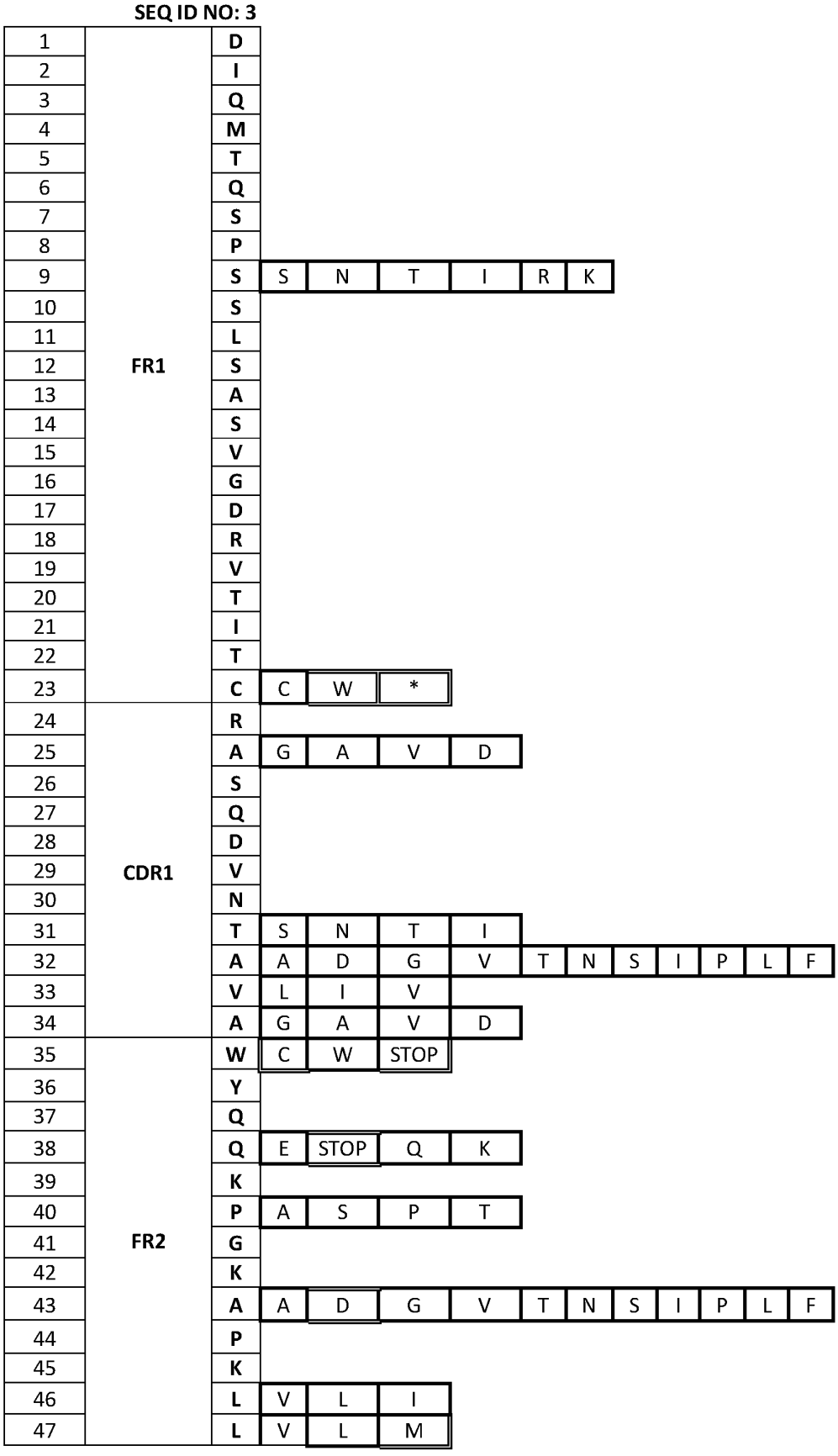
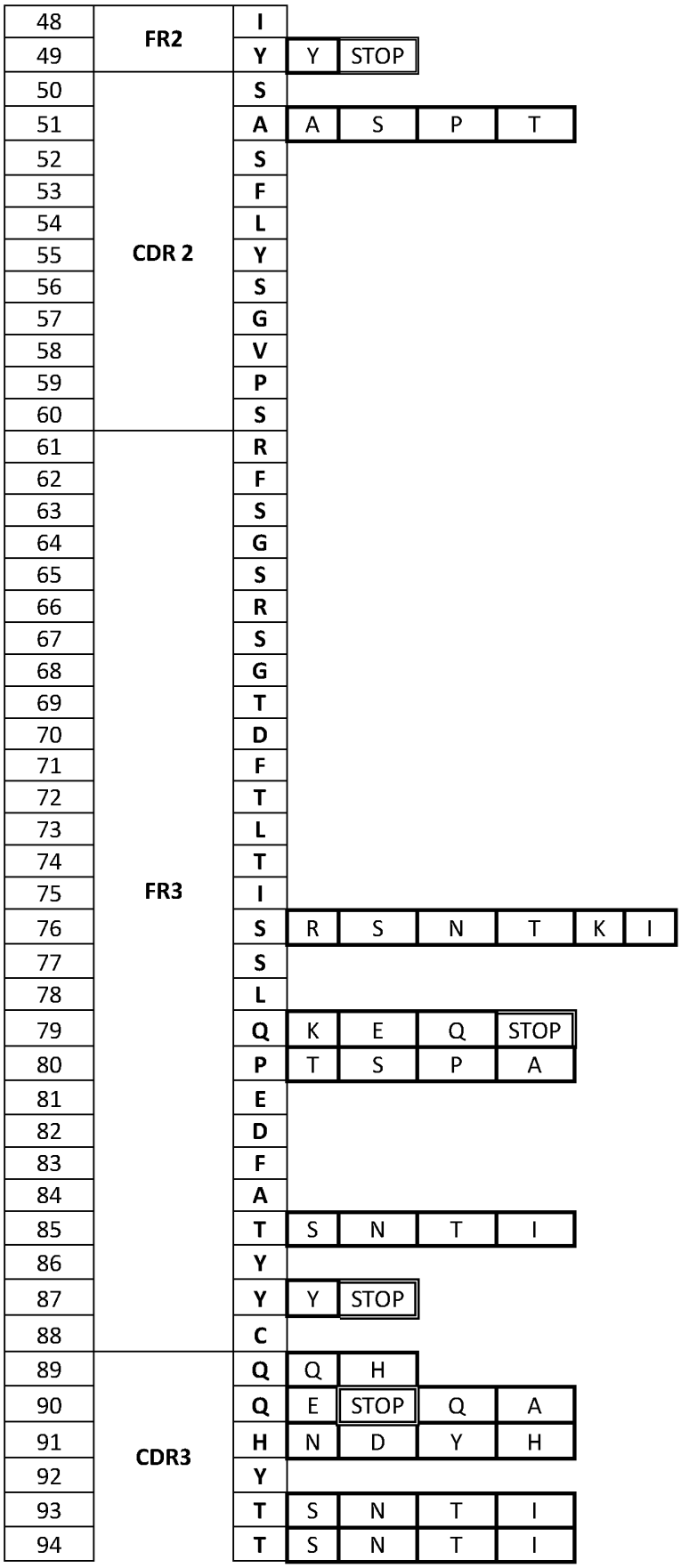

SEQ ID NO: 3
FR1
CDR1
FR2
1 D
2 I
3 Q
4 M
5 T
6 Q
7 S
8 P
9 S S N T I R K
10 S
11 L
12 S
13 A
14 S
15 V
16 G
17 D
18 R
19 V
20 T
21 I
22 T
23 C C W *
24 R
25 A G A V D
26 S
27 Q
28 D
29 V
30 N
31 T S N T I
32 A A D G V T N S I P L F
33 V L I V
34 A G A V D
35 W C W STOP
36 Y
37 Q
38 Q E STOP Q K
39 K
40 P A S P T
41 G
42 K
43 A A D G V T N S I P L F
44 P
45 K
46 L V L I
47 L V L M

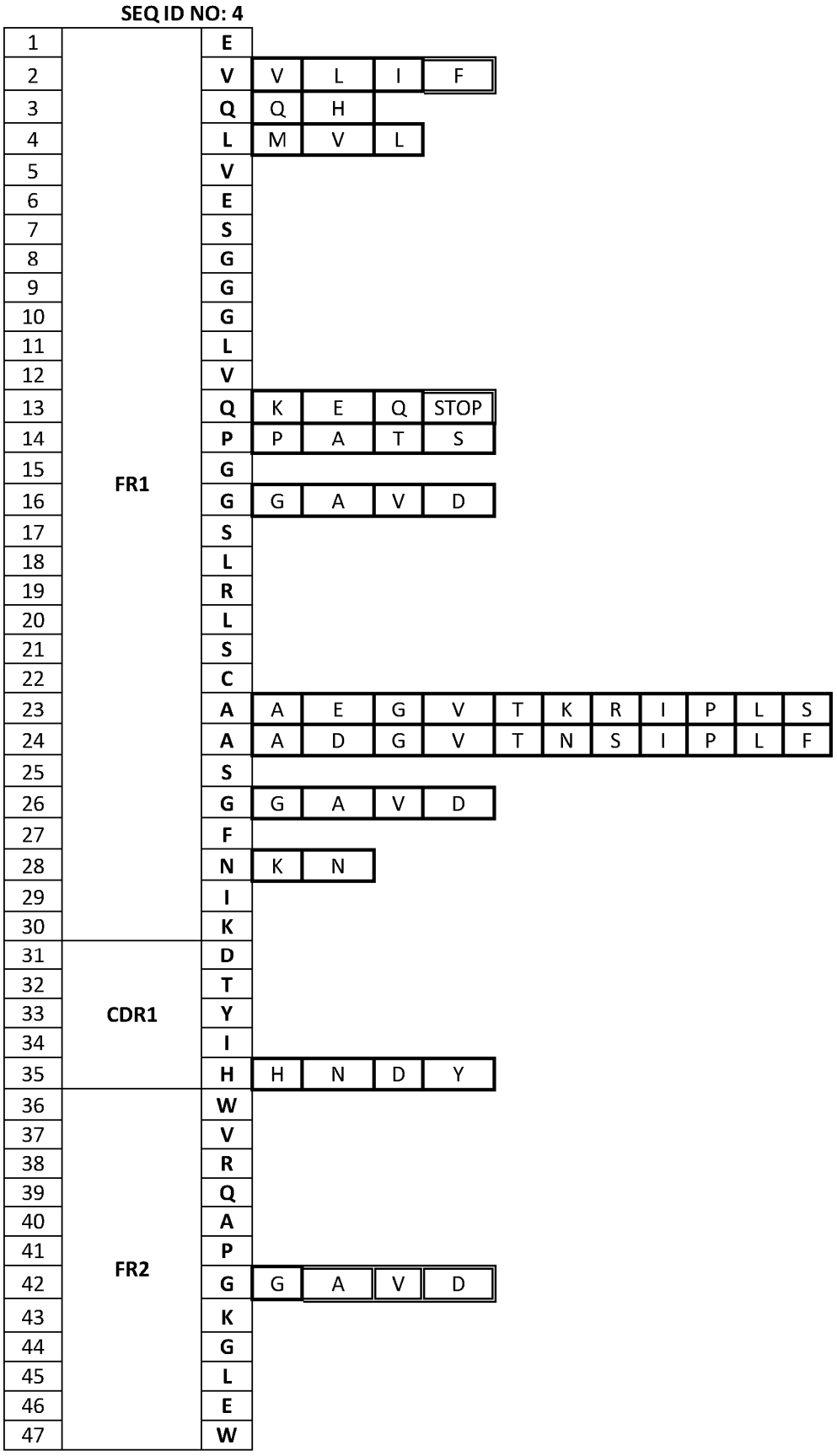
Figura 7
(Continuação)



95		**P**				
96		**P**				
97	**CDR3**	**T**				
98	**FR4**	**F**				
99		**G**				
100		**Q**				
101		**G**	G	A	V	D
102		**T**	S	N	T	I
103		**K**				
104		**V**				
105		**E**				
106		**I**				
107		**K**				

Figura 7 (Continuação)

Figura 8



1		E										
2		V	V	L	I	F						
3		Q	Q	H								
4		L	M	V	L							
5		V										
6		E										
7		S										
8		G										
9		G										
10		G										
11		L										
12		V										
13		Q	K	E	Q	STOP						
14		P	P	A	T	S						
15		G										
16	FR1	G	G	A	V	D						
17		S										
18		L										
19		R										
20		L										
21		S										
22		C										
23		A	A	E	G	V	T	K	R	I	P	L	S
24		A	A	D	G	V	T	N	S	I	P	L	F
25		S										
26		G	G	A	V	D						
27		F										
28		N	K	N								
29		I										
30		K										
31		D										
32		T										
33	CDR1	Y										
34		I										
35		H	H	N	D	Y						
36		W										
37		V										
38		R										
39		Q										
40		A										
41		P										
42	FR2	G	G	A	V	D						
43		K										
44		G										
45		L										
46		E										
47		W										

Figura 8 (Continuação)

48	FR2	V	F	L	V	I						
49		A	A	E	G	V	T	K	R	I	P	L	S
50	CDR2	R										
51		I										
52		Y										
53		P										
54		T										
55		N										
56		G	G	A	V	D						
57		Y										
58		T	S	N	T	I						
59		R										
60		Y										
61		A	G	A	V	D						
62		D										
63		S										
64		V										
65		K										
66		G										
67	FR3	R										
68		F										
69		T										
70		I										
71		S										
72		A										
73		D										
74		T										
75		S										
76		K										
77		N	K	N								
78		T										
79		A	G	A	V	D						
80		Y	Y	STOP								
81		L										
82		Q	E	K	Q	STOP						
83		M										
84		N	K	N								
85		S	R	S								
86		L										
87		R										
88		A	A	D	G	V	T	N	S	I	P	L	F
89		E										
90		D										
91		T										
92		A	G	A	V	D						
93		V										
94		Y										
95		Y										

96	FR3	C	F	S	Y	C						
97		S										
98		R										
99		W										
100	CDR3	G										
101		G										
102		D										
103		G	G	A	V	D						
104		F										
105		Y										
106		A	A	D	G	V	T	N	S	I	P	L	F
107		M										
108		D										
109		Y										
110	FR4	W										
111		G										
112		Q										
113		G										
114		T	S	N	T	I						
115		L										
116		V										
117		T										
118		V										
119		S										
120		S										

|Figura 8 (Continuação)

Figura 9

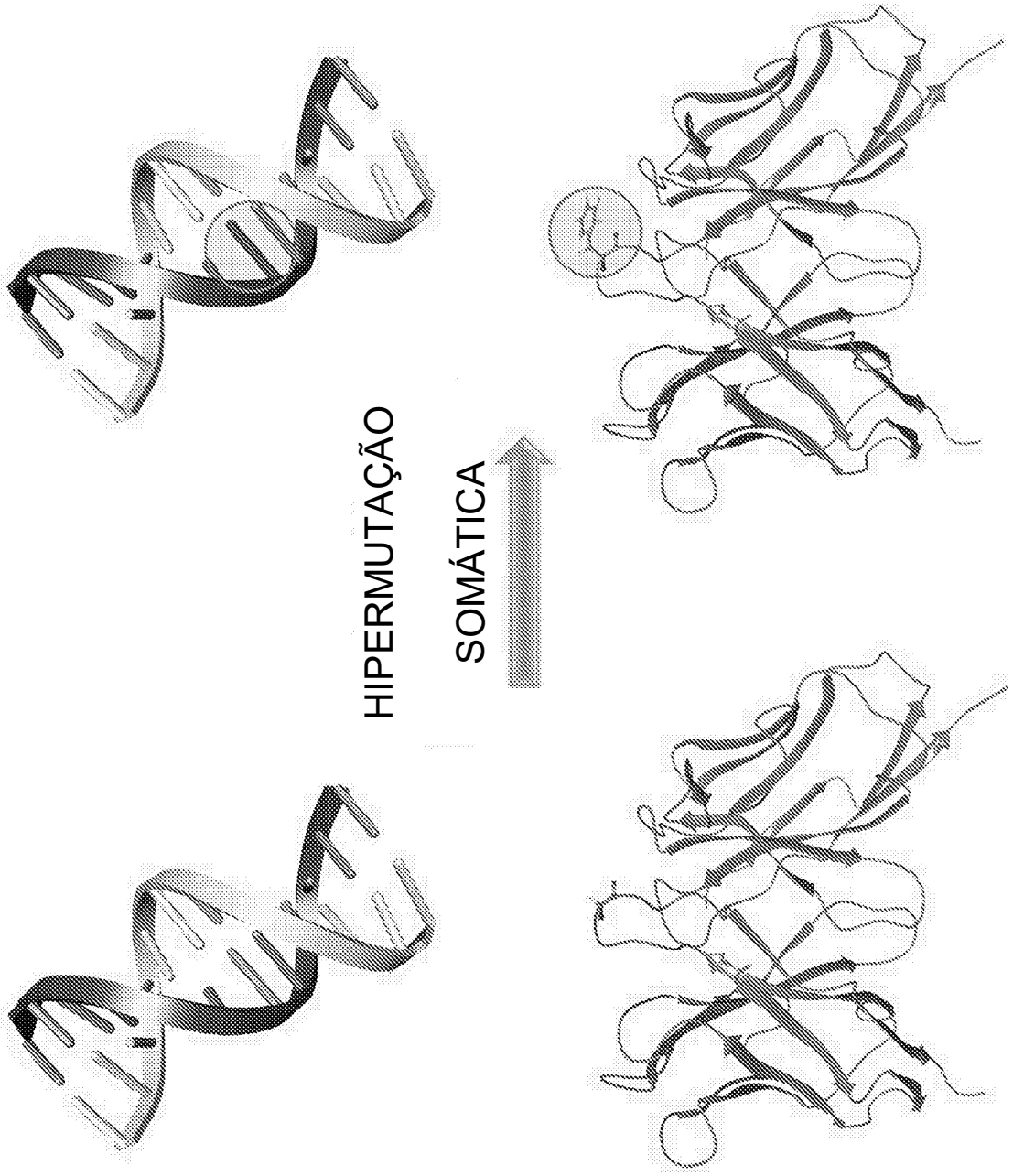


Figura 10

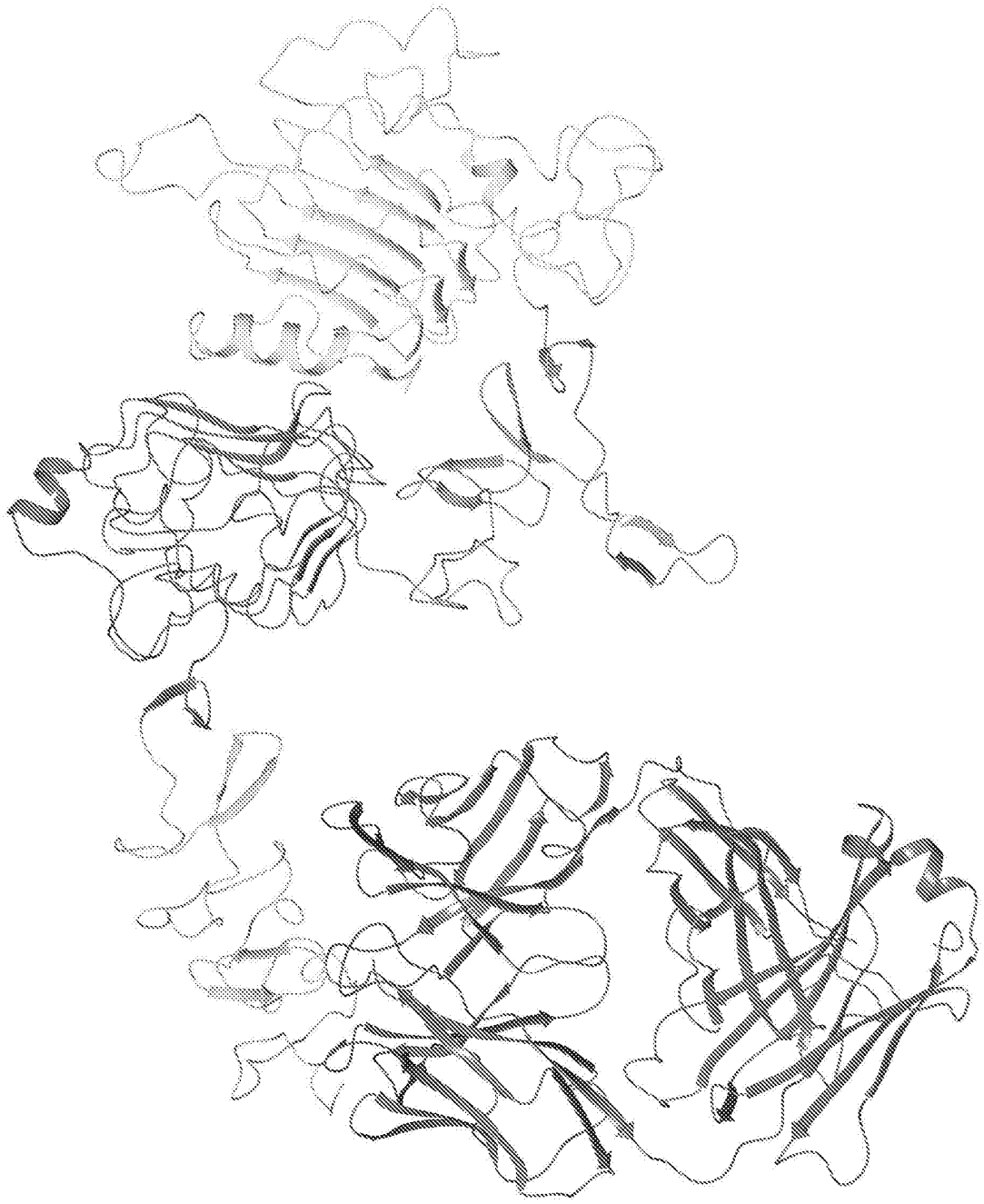


Figura 11A

1 Mutação

Número de Variante	Resíduo	**Original**	Mutado	Δ Afinidade	Δ Estabilidade
1	L:51	ALA	THR	**-4.33**	7.33
2	H:103	GLY	VAL	**-3.99**	19.62
3	L:31	THR	SER	**-3.56**	7.03
4	H:103	GLY	ALA	**-3.01**	1.12
5	L:25	ALA	VAL	-1.74	45.76
6	L:32	ALA	VAL	-1.42	37.08
7	L:93	THR	ILE	-0.91	***-6.9***
8	L:9	SER	LYS	-0.77	4.2
9	L:9	SER	ARG	-0.71	***-9.36***
10	L:93	THR	ASN	-0.49	6.78
11	L:9	SER	ILE	-0.34	***-5.4***
12	L:46	LEU	ILE	-0.28	11.43
13	H:85	SER	ARG	-0.25	***-10.35***
14	L:31	THR	ILE	-0.18	1.53
15	L:34	ALA	GLY	-0.17	5.6
16	H:114	THR	ILE	-0.17	***-9.08***
17	H:61	ALA	GLY	-0.16	4.56
18	L:51	ALA	PRO	-0.15	57.67
19	H:56	GLY	ALA	-0.15	0.43
20	H:79	ALA	GLY	-0.15	8.7
21	L:25	ALA	GLY	-0.11	8.48
22	L:46	LEU	VAL	-0.1	16.58
23	H:24	ALA	GLY	-0.1	6.2
24	H:79	ALA	VAL	-0.1	***-10.71***
25	H:114	THR	ASN	-0.07	-1.79
26	H:114	THR	SER	-0.06	0.82
27	L:47	LEU	VAL	-0.05	8.2
28	H:48	VAL	LEU	-0.05	10.23
29	L:101	GLY	VAL	-0.03	1.3
30	H:48	VAL	ILE	-0.02	0.64
31	L:43	ALA	GLY	-0.01	4.12
32	L:9	SER	THR	0	***-4.63***
33	L:51	ALA	SER	0	2.2
34	L:76	SER	THR	0	***-6.43***
35	L:80	PRO	THR	0	***-4.29***
36	L:80	PRO	SER	0	0.3
37	H:4	LEU	VAL	0	15.82
38	H:14	PRO	THR	0	1.28
39	H:14	PRO	ALA	0	6.03
40	H:14	PRO	SER	0	6.35
41	H:88	ALA	VAL	0	***-3.97***
42	H:88	ALA	GLY	0	2.56
43	L:40	PRO	THR	0.01	8.27
44	L:40	PRO	SER	0.01	6.92
45	L:80	PRO	ALA	0.01	2.89
46	L:101	GLY	ALA	0.01	3.6
47	H:16	GLY	ALA	0.01	1.65
48	L:40	PRO	ALA	0.02	6.79
49	L:43	ALA	PRO	0.03	***-2.02***
50	L:85	THR	SER	0.03	5.27
51	H:2	VAL	LEU	0.03	12.41
52	H:16	GLY	VAL	0.03	4.11
53	H:58	THR	SER	0.03	6.62
54	H:92	ALA	GLY	0.03	6.24
55	L:43	ALA	ASN	0.04	***-7.99***
56	H:2	VAL	ILE	0.04	***-2.26***
57	H:61	ALA	VAL	0.04	-1.73
58	L:102	THR	ILE	0.05	***-2.42***
59	L:43	ALA	PHE	0.06	0.82
60	H:3	GLN	HID	0.07	6.94
61	H:56	GLY	VAL	0.07	-1.4
62	L:76	SER	ILE	0.08	***-10.69***

Figura 11A (Continuação)

63	L:93	THR	SER	0.08	2.35
64	L:102	THR	ASN	0.08	6.08
65	H:48	VAL	PHE	0.08	119.92
66	L:85	THR	ILE	0.09	***-5.15***
67	L:89	GLN	HID	0.09	13.16
68	H:24	ALA	PRO	0.09	32.5
69	H:4	LEU	MET	0.1	***-5.89***
70	L:34	ALA	VAL	0.11	9.25
71	H:26	GLY	ALA	0.11	***-7.27***
72	H:92	ALA	VAL	0.11	47.33
73	L:85	THR	ASN	0.14	3.85
74	H:106	ALA	GLY	0.15	7.17
75	L:102	THR	SER	0.16	0.32
76	L:76	SER	ASN	0.19	***-3.06***
77	H:26	GLY	VAL	0.21	***-7.3***
78	H:88	ALA	ASP	0.3	-0.16
79	H:58	THR	ASN	0.36	1.07
80	H:24	ALA	PHE	0.39	78.02
81	H:58	THR	ILE	0.49	2.2
82	H:24	ALA	ASN	0.5	17.06
83	H:26	GLY	ASP	0.53	***-7.85***
84	H:92	ALA	ASP	0.62	28.05
85	H:106	ALA	VAL	0.68	8.45
86	L:101	GLY	ASP	0.69	11.64
87	H:61	ALA	ASP	0.9	6.52
88	H:56	GLY	ASP	1.26	3.08
89	L:32	ALA	GLY	1.75	11.73
90	H:79	ALA	ASP	1.84	21.41
91	L:31	THR	ASN	1.91	0.6
92	L:25	ALA	ASP	2.84	86.7
93	H:106	ALA	ASP	3.94	28.94
94	L:34	ALA	ASP	4.24	36.04
95	L:32	ALA	ASP	11.37	16.31
96	H:103	GLY	ASP	12.53	16.85

Figura 11B

2 Mutações

Número	Resíduo	**Original**	Mutado	Δ Afinidade	Δ Estabilidade
1	L:9 L:43	SER ALA	LYS PHE	**-26.91**	66.79
2	L:9 L:43	SER ALA	THR PHE	**-26.08**	62.78
3	L:9 H:103	SER GLY	ARG VAL	**-24.17**	33.13
4	L:9 H:103	SER GLY	LYS VAL	**-23.96**	43.24
5	L:9 H:103	SER GLY	THR VAL	**-23.23**	35.33
6	L:9 H:103	SER GLY	ILE VAL	**-23.21**	35.04
7	L:9 H:103	SER GLY	LYS ALA	**-20.26**	1.22
8	L:9 H:103	SER GLY	ARG ALA	**-20.01**	**-11.42**
9	L:9 L:102	SER THR	THR ASN	**-18.24**	37.61
10	L:9 L:40	SER PRO	ARG ALA	**-18.91**	25.27
11	L:9 H:103	SER GLY	THR ALA	**-18.59**	**-5.37**
12	L:9 H:103	SER GLY	ILE ALA	**-18.57**	**-6.91**
13	L:9 L:32	SER ALA	THR VAL	**-18.32**	48.63
14	L:9 L:102	SER THR	THR ASN	**-18.24**	37.61
15	L:9 L:102	SER THR	ILE ASN	**-18.22**	37.32
16	L:9	SER	THR	**-18.2**	23.83
17	L:9	SER	ILE	**-18.19**	23.47
18	L:9 L:40	SER PRO	ILE ALA	**-18.18**	30.15
19	L:9 H:2	SER VAL	THR LEU	**-18.1**	27.69
20	L:9 L:93	SER THR	ARG ASN	**-17.86**	23.9
21	L:9 L:32	SER ALA	LYS VAL	**-17.51**	**-30.41**
22	L:9 L:32	SER ALA	ARG VAL	**-17.46**	**-42.8**
23	L:9 L:80	SER PRO	ARG ALA	**-16.83**	**-74.92**
24	L:9 L:51	SER ALA	ARG SER	**-16.81**	56.69
25	L:9 L:51	SER ALA	LYS PRO	**-16.7**	55.02
26	L:9 H:92	SER ALA	LYS VAL	**-16.64**	**-43.9**
27	L:9 H:14	SER PRO	LYS SER	**-16.6**	**-51.7**
28	L:9 H:79	SER ALA	ARG GLY	**-16.58**	**-60.45**
29	L:9 L:43	SER ALA	ARG ASN	**-16.58**	**-84.28**
30	L:9 L:25	SER ALA	ARG GLY	**-16.56**	69.73

31	L:9 L:93	SER THR	ARG SER	**-16.55**	**-69.14**
32	L:9 H:16	SER GLY	LYS ALA	**-16.55**	**-58.01**
33	L:9 L:93	SER THR	ARG ILE	**-16.55**	**-21.78**
34	L:9 H:58	SER THR	ILE SER	**-16.54**	**-63.79**
35	L:9 L:93	SER THR	THR ILE	**-16.53**	**-73.77**
36	L:9 L:102	SER THR	ARG ASN	**-16.53**	**-54.45**
37	L:9 H:48	SER VAL	LYS ILE	**-16.52**	**-54.76**
38	L:9 H:56	SER GLY	LYS ALA	**-16.51**	**-64.22**
39	L:9 L:47	SER LEU	LYS VAL	**-16.5**	**-51.96**
40	L:9 L:76	SER SER	ARG THR	**-16.5**	**-79.57**
41	L:9 L:101	SER GLY	ARG ALA	**-16.5**	**-71.42**
42	L:9 H:56	SER GLY	ILE ALA	**-16.49**	**-69.38**
43	L:9 H:2	SER VAL	ARG ILE	**-16.45**	**-75.03**
44	L:9 H:114	SER THR	ARG SER	**-16.44**	**-66.76**
45	L:9 H:14	SER PRO	ARG ALA	**-16.44**	**-71.28**
46	L:9 L:43	SER ALA	ARG PRO	**-16.43**	**-76.51**
47	L:9 H:61	SER ALA	LYS VAL	**-16.39**	**-60.92**
48	L:9 H:61	SER ALA	ARG VAL	**-16.38**	**-74.21**
49	L:9 L:43	SER ALA	ARG PHE	**-16.33**	60.52
50	L:9 H:58	SER THR	ARG ILE	**-16.32**	**-72.44**
51	L:9 L:31	SER THR	LYS SER	**-16.31**	**-54.16**
52	L:9 L:31	SER THR	ARG SER	**-16.29**	**-67.24**
53	L:9 H:88	SER ALA	LYS ASP	**-16.28**	**-61.14**
54	L:9 H:24	SER ALA	LYS ASN	**-16.25**	**-57.56**
55	L:9 H:58	SER THR	ARG SER	**-16.23**	1.68
56	L:9 L:46	SER LEU	ARG VAL	**-16.21**	12.27
57	L:9 H:24	SER ALA	ARG ASN	**-16.19**	**-69.82**
58	L:9 L:51	SER ALA	LYS THR	**-16.19**	**-9.02**
59	L:9 H:106	SER ALA	LYS VAL	**-16.16**	**-54.48**
60	L:9 H:114	SER THR	LYS ILE	**-16.16**	**-12.53**
61	L:9 L:93	SER THR	ILE ILE	**-16.16**	**-76.44**

Figura 11B (Continuação)

Figura 11B (Continuação)

62	L:9 H:88	SER ALA	THR VAL	**-16.14**	**-76.29**
63	L:9 L:51	SER ALA	ARG THR	**-16.12**	**-21.44**
64	L:9 L:101	SER GLY	THR ALA	**-16.12**	**-70.99**
65	L:9 L:34	SER ALA	ARG VAL	**-16.09**	6.58
66	L:9 L:51	SER ALA	THR PRO	**-16.09**	48.2
67	L:9 H:61	SER ALA	ARG GLY	**-16.08**	0.92
68	L:9 H:61	SER ALA	LYS GLY	**-16.06**	12.12
69	L:9 H:79	SER ALA	ARG VAL	**-16.06**	**-19.38**
70	L:9 L:85	SER THR	THR ILE	**-16.05**	**-78.22**
71	L:9 H:106	SER ALA	LYS GLY	**-16.05**	19.57
72	L:9 H:114	SER THR	LYS ASN	**-16.04**	**-5.16**
73	L:9 H:114	SER THR	ARG ASN	**-16.02**	**-17.55**
74	L:9 L:93	SER THR	LYS ILE	**-16.02**	**-13.85**
75	L:9 L:43	SER ALA	LYS GLY	**-16.01**	1.02
76	L:9 L:76	SER SER	LYS THR	**-16**	**-9.72**
77	L:9	SER	LYS	**-16**	**-3.24**
78	L:9 L:25	SER ALA	LYS VAL	**-16**	62.99
79	L:9 H:58	SER THR	LYS SER	**-15.99**	2.62
80	L:9 L:85	SER THR	LYS SER	**-15.98**	**-4.34**
81	L:9 L:85	SER THR	ARG SER	**-15.97**	**-16.83**
82	L:9 H:14	SER PRO	LYS THR	**-15.96**	**-3.27**
83	L:9 L:46	SER LEU	ILE ILE	**-15.96**	**-60.4**
84	L:9 L:80	SER PRO	ARG THR	**-15.96**	**-27.85**
85	L:9 L:43	SER ALA	ARG GLY	**-15.95**	**-11.52**
86	L:9 H:26	SER GLY	ARG VAL	**-15.94**	4.91
87	L:9 H:48	SER VAL	LYS LEU	**-15.93**	13.32
88	L:9 H:79	SER ALA	LYS VAL	**-15.93**	**-4.21**
89	L:9 H:48	SER VAL	ARG ILE	**-15.93**	**-17.62**
90	L:9 L:85	SER THR	ARG ILE	**-15.92**	**-8.89**
91	L:9 H:58	SER THR	THR SER	**-15.9**	**-61.71**
92	L:9 H:48	SER VAL	ARG PHE	**-15.89**	133.57
93	L:9 L:25	SER ALA	THR GLY	**-15.89**	**-54.93**

Figura 11B (Continuação)

94	L:9 H:4	SER LEU	ARG MET	**-15.88**	**-4.6**
95	L:9 L:85	SER THR	LYS ILE	**-15.88**	**-9.08**
96	L:9 H:56	SER GLY	THR ALA	**-15.86**	**-67.29**
97	L:9 L:76	SER SER	ILE THR	**-15.86**	**-18.81**
98	L:9 L:93	SER THR	THR SER	**-15.86**	**-64.34**
99	L:9 H:14	SER PRO	THR SER	**-15.84**	**-58.59**
100	L:9 L:80	SER PRO	ILE SER	**-15.81**	**-69.43**
101	L:9 L:89	SER GLN	LYS HID	**-15.81**	3.09
102	L:9 H:48	SER VAL	THR LEU	**-15.81**	**-51.33**
103	L:9 H:16	SER GLY	THR ALA	**-15.79**	**-64.81**
104	L:9 L:43	SER ALA	THR PRO	**-15.79**	**-73.51**
105	L:9 H:3	SER GLN	LYS HID	**-15.78**	75.97
106	L:9 H:92	SER ALA	ILE VAL	**-15.78**	**-52.87**
107	L:9 L:80	SER PRO	THR ALA	**-15.78**	**-64.55**
108	L:9 L:93	SER THR	ILE SER	**-15.76**	**-63.25**
109	L:9 H:88	SER ALA	ILE VAL	**-15.76**	**-73.28**
110	L:9 L:43	SER ALA	ILE PRO	**-15.76**	**-75.35**
111	L:9 H:58	SER THR	LYS ILE	**-15.76**	-1.84
112	L:9 L:46	SER LEU	LYS VAL	**-15.75**	83.94
113	L:9 L:40	SER PRO	ILE SER	**-15.74**	**-62.95**
114	L:9 H:79	SER ALA	LYS GLY	**-15.72**	74.64
115	L:9 H:3	SER GLN	ARG HID	**-15.72**	64
116	L:9 L:25	SER ALA	ARG VAL	**-15.7**	42.01
117	L:9 L:25	SER ALA	LYS GLY	**-15.69**	75.85
118	L:9 H:4	SER LEU	LYS MET	**-15.68**	64.29
119	L:9 L:43	SER ALA	LYS ASN	**-15.67**	59.33
120	L:9 L:40	SER PRO	LYS THR	**-15.64**	75.96
121	L:9 H:24	SER ALA	LYS GLY	**-15.63**	73.96
122	L:9 H:56	SER GLY	ARG ALA	**-15.63**	63.88
123	L:9 L:46	SER LEU	ARG ILE	**-15.62**	69.38
124	L:9 H:24	SER ALA	ARG GLY	**-15.62**	61.59

125	L:9 H:14	SER PRO	ARG SER	**-15.61**	63.52
126	L:9 H:88	SER ALA	ARG GLY	**-15.61**	57.74
127	L:9 L:80	SER PRO	LYS SER	**-15.6**	67.39
128	L:9 H:56	SER GLY	LYS VAL	**-15.59**	**-4.12**
129	L:9 L:80	SER PRO	LYS THR	**-15.58**	**-6.83**
130	L:9 H:16	SER GLY	ARG ALA	**-15.58**	52.51
131	L:9 L:76	SER SER	ARG ILE	**-15.58**	44.51
132	L:9 L:102	SER THR	LYS ILE	**-15.58**	81.18
133	L:9 H:48	SER VAL	ARG LEU	**-15.58**	63.85
134	L:9 L:34	SER ALA	LYS GLY	**-15.58**	4.93
135	L:9 H:92	SER ALA	LYS GLY	**-15.57**	77.1
136	L:9 H:16	SER GLY	ARG VAL	**-15.57**	51.75
137	L:9 L:102	SER THR	ARG ILE	**-15.57**	68.15
138	L:9 L:34	SER ALA	ARG GLY	**-15.57**	**-7.48**
139	L:9 H:2	SER VAL	ARG LEU	**-15.56**	69.54
140	L:9 L:47	SER LEU	ARG VAL	**-15.56**	63.8
141	L:9 L:40	SER PRO	LYS SER	**-15.56**	77.58
142	L:9 L:80	SER PRO	ARG SER	**-15.56**	**-14.69**
143	L:9 H:26	SER GLY	LYS VAL	**-15.56**	68.81
144	L:9 H:85	SER SER	LYS ARG	**-15.55**	**-2.09**
145	L:9 L:76	SER SER	LYS ASN	**-15.55**	64.54
146	L:9 L:40	SER PRO	ARG SER	**-15.55**	65.26
147	L:9 L:89	SER GLN	ILE HID	**-15.55**	0.8
148	L:9 H:4	SER LEU	ARG VAL	**-15.55**	73.02
149	L:9 L:85	SER THR	LYS ASN	**-15.55**	73.89
150	L:9 H:16	SER GLY	LYS VAL	**-15.55**	**-5.53**
151	L:9 H:24	SER ALA	ARG PRO	**-15.54**	6.7
152	L:9 L:40	SER PRO	LYS ALA	**-15.53**	74.11
153	L:9 L:85	SER THR	ARG ASN	**-15.53**	**-11.09**

Figura 11B (Continuação)

Figura 11C

3 Mutações

Número	Resíduo	Original	Mutado	Δ Afinidade	Δ Estabilidade
1	L:9	SER	ARG	-31.23	-36.46
	L:43	ALA	PHE		
	H:114	THR	SER		
2	L:9	SER	THR	-30.47	-78.74
	L:43	ALA	PHE		
	H:114	THR	ASN		
3	L:9	SER	THR	-29.97	-76.82
	L:43	ALA	PHE		
	H:114	THR	ILE		
4	L:9	SER	LYS	-28.37	-45.98
	L:43	ALA	PHE		
	H:106	ALA	VAL		
5	L:9	SER	LYS	-27.14	-21.57
	L:43	ALA	PHE		
	H:114	THR	SER		
6	L:9	SER	THR	-26.36	-37.27
	L:43	ALA	PHE		
	H:114	THR	SER		
7	L:9	SER	LYS	-25.73	-25.84
	L:43	ALA	PHE		
	H:106	ALA	GLY		
8	L:9	SER	LYS	-24.74	-62.52
	H:103	GLY	ALA		
	H:114	THR	ASN		
9	L:9	SER	LYS	-24.69	-56.48
	H:103	GLY	ALA		
	H:114	THR	SER		
10	L:9	SER	LYS	-24.39	-31.96
	H:103	GLY	ALA		
	H:106	ALA	GLY		
11	L:9	SER	ARG	-24.23	-44.64
	H:103	GLY	ALA		
	H:106	ALA	VAL		
12	L:9	SER	ARG	-23.91	-67.4
	H:103	GLY	ALA		
	H:114	THR	SER		
13	L:9	SER	ARG	-23.83	-77.36
	H:103	GLY	ALA		
	H:114	THR	ILE		
14	L:9	SER	ARG	-23.61	-73.47
	H:103	GLY	ALA		
	H:114	THR	ASN		
15	L:9	SER	ARG	-23.51	-43.94
	H:103	GLY	ALA		
	H:106	ALA	GLY		
16	L:9	SER	ILE	-23.44	-41.02
	H:103	GLY	ALA		
	H:106	ALA	GLY		
17	L:9	SER	LYS	-23.39	-67.34
	H:103	GLY	ALA		
	H:114	THR	ILE		
18	L:9	SER	LYS	-23.27	-35.88
	H:103	GLY	ALA		
	H:106	ALA	VAL		
19	L:9	SER	ILE	-23.14	-44.47
	H:103	GLY	ALA		
	H:106	ALA	VAL		
20	L:9	SER	ILE	-23.13	-69.27
	H:103	GLY	ALA		
	H:114	THR	ASN		

Figura 11C (Continuação)

21	L:9 L:51 H:114	SER ALA THR	ARG THR SER	**-22.85**	**-32.94**
22	L:9 H:103 H:106	SER GLY ALA	THR ALA GLY	**-22.81**	**-38.94**
23	L:9 H:103 H:114	SER GLY THR	THR ALA ILE	**-22.68**	**-74.57**
24	L:9 H:103 H:114	SER GLY THR	ILE ALA ILE	**-22.54**	**-78.31**
25	L:9 H:103 H:114	SER GLY THR	THR ALA ASN	**-22.53**	**-67.13**
26	L:9 H:103 H:114	SER GLY THR	THR ALA SER	**-22.52**	**-64.56**
27	L:9 H:103 H:106	SER GLY ALA	THR ALA VAL	**-22.51**	**-42.54**
28	L:9 H:103 H:114	SER GLY THR	ILE ALA SER	**-22.49**	**-66.44**
29	L:9 H:114	SER THR	LYS ASN	**-22.18**	**-19.52**
30	L:9 H:24 H:114	SER ALA THR	ARG PRO ASN	**-22.16**	**-17.48**
31	L:9 L:76 H:114	SER SER THR	LYS ASN ASN	**-22.13**	**-35.83**
32	L:9 L:51 H:114	SER ALA THR	ARG THR ASN	**-22.09**	**-67.18**
33	L:9 H:92 H:114	SER ALA THR	ARG VAL SER	**-21.9**	**-21.63**
34	L:9 H:114	SER THR	ARG ASN	**-21.83**	**-42.75**
35	L:9 H:92 H:114	SER ALA THR	LYS ASP SER	**-21.81**	**-3.58**
36	L:9 L:46 H:114	SER LEU THR	ARG VAL ASN	**-21.75**	**-54.78**
37	L:9 H:2 H:114	SER VAL THR	LYS ILE ASN	**-21.74**	**-34.8**
38	L:9 L:47 H:114	SER LEU THR	ARG VAL ILE	**-21.68**	**-43.52**
39	L:9 H:24 H:114	SER ALA THR	LYS GLY ILE	**-21.64**	**-34.99**
40	L:9 L:51 H:114	SER ALA THR	LYS THR ASN	**-21.6**	**-59.8**
41	L:9 L:102 H:114	SER THR THR	LYS ASN ILE	**-21.58**	**-56.69**

Figura 11C (Continuação)

42	L:9 L:32 H:114	SER ALA THR	LYS VAL ASN	**-21.57**	**-37.67**
43	L:9 L:34 H:114	SER ALA THR	LYS VAL SER	**-21.53**	**-18.63**
44	L:9 H:24 H:114	SER ALA THR	LYS GLY ASN	**-21.49**	**-27.52**
45	L:9 L:34 H:114	SER ALA THR	LYS VAL ASN	**-21.47**	**-9.63**
46	L:9 L:34 H:114	SER ALA THR	ARG VAL ILE	**-21.47**	**-46.2**
47	L:9 H:48 H:114	SER VAL THR	ARG PHE ILE	**-21.46**	**-18.79**
48	L:9 L:25 H:114	SER ALA THR	LYS GLY ILE	**-21.45**	**-32.92**
49	L:9 H:114	SER THR	LYS SER	**-21.43**	**-30.02**
50	L:9 H:24 H:114	SER ALA THR	LYS GLY SER	**-21.42**	**-23.34**
51	L:9 H:3 H:114	SER GLN THR	ARG HID ASN	**-21.42**	**-40.42**
52	L:9 L:34 H:114	SER ALA THR	ARG GLY ILE	**-21.36**	**-49.09**
53	L:9 L:43 H:114	SER ALA THR	LYS PRO ASN	**-21.34**	**-36.84**
54	L:9 H:114	SER THR	LYS ILE	**-21.33**	**-41.62**
55	L:9 H:85 H:114	SER SER THR	LYS ARG ILE	**-21.33**	**-33.57**
56	L:9 L:47 H:114	SER LEU THR	LYS VAL SER	**-21.33**	**-19.04**
57	L:9 L:47 H:114	SER LEU THR	ARG VAL ASN	**-21.32**	**-35.6**
58	L:9 L:80 H:114	SER PRO THR	ARG THR ASN	**-21.32**	**-50.76**
59	L:9 L:47 H:114	SER LEU THR	ARG VAL SER	**-21.31**	**-33.05**
60	L:9 L:46 H:114	SER LEU THR	LYS VAL ILE	**-21.31**	**-23.06**
61	L:9 L:40 H:114	SER PRO THR	LYS SER SER	**-21.31**	**-23.36**
62	L:9 L:47 H:114	SER LEU THR	LYS VAL ILE	**-21.31**	**-30.61**

Figura 11C (Continuação)

63	L:9 H:4 H:114	SER LEU THR	LYS VAL SER	**-21.31**	**-16.24**
64	L:9 H:48 H:114	SER VAL THR	LYS PHE SER	**-21.31**	5.13
65	L:9 H:56 H:114	SER GLY THR	ARG ALA ILE	**-21.3**	**-78.22**
66	L:9 H:48 H:114	SER VAL THR	LYS PHE ILE	**-21.29**	5.19
67	L:9 L:102 H:114	SER THR THR	LYS ILE ILE	**-21.29**	**-14.8**
68	L:9 H:48 H:114	SER VAL THR	LYS LEU SER	**-21.29**	**-28.52**
69	L:9 H:92 H:114	SER ALA THR	LYS GLY SER	**-21.29**	**-17.89**
70	L:9 H:2 H:114	SER VAL THR	LYS ILE SER	**-21.28**	**-29.52**
71	L:9 H:48 H:114	SER VAL THR	ARG LEU SER	**-21.28**	**-40.34**
72	L:9 L:51 H:114	SER ALA THR	ILE SER SER	**-21.28**	**-43.45**
73	L:9 H:48 H:114	SER VAL THR	LYS LEU ILE	**-21.27**	**-40.08**
74	L:9 H:92 H:114	SER ALA THR	LYS GLY ILE	**-21.27**	**-29.49**
75	L:9 H:88 H:114	SER ALA THR	LYS GLY ASN	**-21.26**	**-16.12**
76	L:9 H:48 H:114	SER VAL THR	ARG PHE SER	**-21.24**	**-7.2**
77	L:9 H:114	SER THR	ARG SER	**-21.24**	**-39.89**
78	L:9 L:51 H:114	SER ALA THR	LYS THR ILE	**-21.23**	**-65.88**
79	L:9 H:114	SER THR	ARG ILE	**-21.22**	**-51.47**
80	L:9 H:92 H:114	SER ALA THR	ARG GLY SER	**-21.22**	**-30.22**
81	L:9 L:85 H:114	SER THR THR	ARG ASN ASN	**-21.22**	**-42.91**
82	L:9 H:2 H:114	SER VAL THR	ARG ILE SER	**-21.21**	**-41.86**
83	L:9 H:92 H:114	SER ALA THR	ARG GLY ILE	**-21.21**	**-41.81**

Figura 11C (Continuação)

84	L:9 L:76 H:114	SER SER THR	LYS THR ASN	**-21.21**	**-25.66**
85	L:9 L:51 H:114	SER ALA THR	ARG PRO ILE	**-21.17**	-1.63
86	L:9 H:16 H:114	SER GLY THR	LYS ALA SER	**-21.16**	**-18.68**
87	L:9 H:3 H:114	SER GLN THR	LYS HID ILE	**-21.15**	**-34.4**
88	L:9 H:24 H:114	SER ALA THR	THR GLY ILE	**-21.14**	**-42.13**
89	L:9 L:47 H:114	SER LEU THR	LYS VAL ASN	**-21.12**	**-57.41**
90	L:9 L:51 H:114	SER ALA THR	LYS THR SER	**-21.11**	**-54.3**
91	L:9 H:3 H:114	SER GLN THR	LYS HID ASN	**-21.11**	**-27.04**
92	L:9 L:43 H:114	SER ALA THR	ARG PHE ASN	**-21.1**	**-75.76**
93	L:9 L:40 H:114	SER PRO THR	LYS SER ASN	**-21.09**	**-59.52**
94	L:9 L:25 H:114	SER ALA THR	LYS GLY SER	**-21.09**	**-22.45**
95	L:9 L:31 H:114	SER THR THR	LYS SER SER	**-21.09**	**-24.73**
96	L:9 H:79 H:114	SER ALA THR	LYS GLY SER	**-21.07**	**-23.51**
97	L:9 L:31 H:114	SER THR THR	ARG SER ILE	**-21.06**	**-51.18**
98	L:9 L:51 H:114	SER ALA THR	ARG THR ILE	**-21.06**	**-77.98**
99	L:9 H:16 H:114	SER GLY THR	LYS ALA ILE	**-21.06**	**-72.79**
100	L:9 L:102 H:114	SER THR THR	LYS SER ASN	**-21.05**	**-28.72**
101	L:9 L:51 H:114	SER ALA THR	ARG SER ASN	**-21.04**	**-89.85**
102	L:9 L:102 H:114	SER THR THR	ARG ILE ILE	**-21.04**	**-70.46**
103	L:9 L:25 H:114	SER ALA THR	LYS VAL ILE	**-21.03**	14.9

104	L:9 L:51 H:114	SER ALA THR	ARG SER SER	**-21.03**	**-87.23**
105	L:9 H:58 H:114	SER THR THR	LYS SER ILE	**-21.03**	**-38.04**
106	L:9 L:51 H:114	SER ALA THR	LYS SER ILE	**-21.02**	**-84.87**
107	L:9 L:34 H:114	SER ALA THR	LYS GLY SER	**-21.02**	**-21.01**
108	L:9 L:34 H:114	SER ALA THR	ARG GLY ASN	**-21.01**	**-41.09**
109	L:9 L:76 H:114	SER SER THR	ARG THR SER	**-21.01**	**-87.7**
110	L:9 L:102 H:114	SER THR THR	LYS ILE ASN	**-21**	**-20.09**
111	L:9 L:34 H:114	SER ALA THR	ARG GLY SER	**-21**	**-38.62**
112	L:9 H:61 H:114	SER ALA THR	LYS GLY ASN	**-21**	**-26.71**
113	L:9 L:40 H:114	SER PRO THR	LYS ALA SER	**-20.99**	**-21.92**
114	L:9 L:102 H:114	SER THR THR	LYS ILE SER	**-20.99**	**-17.55**
115	L:9 H:26 H:114	SER GLY THR	ARG VAL ILE	**-20.99**	**-54.75**
116	L:9 L:85 H:114	SER THR THR	LYS SER ILE	**-20.98**	**-37.13**
117	L:9 L:102 H:114	SER THR THR	ARG SER ASN	**-20.98**	**-40.92**
118	L:9 L:40 H:114	SER PRO THR	LYS ALA ILE	**-20.98**	**-33.49**
119	L:9 H:48 H:114	SER VAL THR	ARG PHE ASN	**-20.98**	**-15.82**
120	L:9 H:58 H:114	SER THR THR	ARG ILE ASN	**-20.98**	**-74.03**
121	L:9 L:80 H:114	SER PRO THR	LYS THR ASN	**-20.98**	**-37.74**
122	L:9 H:3 H:114	SER GLN THR	ARG HID SER	**-20.98**	**-35.12**
123	L:9 L:43 H:114	SER ALA THR	LYS PRO SER	**-20.98**	**-30.74**

Figura 11C (Continuação)

Figura 11C (Continuação)

124	L:9 L:51 H:114	SER ALA THR	ARG SER ILE	**-20.96**	**-97.11**
125	L:9 H:79 H:114	SER ALA THR	LYS GLY ASN	**-20.91**	**-63.43**
126	L:9 L:25 H:114	SER ALA THR	ARG VAL ASN	**-20.85**	**-62.63**
127	L:9 H:24 H:114	SER ALA THR	ARG GLY ASN	**-20.83**	**-71.62**
128	L:9 L:43 H:114	SER ALA THR	ARG PHE ILE	**-20.83**	**-81.93**
129	L:9 L:40 H:114	SER PRO THR	ARG ALA SER	**-20.83**	**-70.96**
130	L:9 L:51 H:114	SER ALA THR	ILE THR ASN	**-20.81**	**-68.13**
131	L:9 L:102 H:114	SER THR THR	ARG ASN ASN	**-20.77**	**-60.94**
132	L:9 L:76 H:114	SER SER THR	ARG THR ASN	**-20.76**	**-84.86**
133	L:9 L:43 H:114	SER ALA THR	ARG GLY ASN	**-20.76**	**-74.39**
134	L:9 H:24 H:114	SER ALA THR	ARG GLY ILE	**-20.76**	**-78.89**
135	L:9 L:76 H:114	SER SER THR	ARG ASN ASN	**-20.75**	**-83.79**
136	L:9 L:40 H:114	SER PRO THR	LYS SER ILE	**-20.75**	**-65.78**
137	L:9 H:79 H:114	SER ALA THR	LYS GLY ILE	**-20.74**	**-65.64**
138	L:9 H:14 H:114	SER PRO THR	ARG ALA ASN	**-20.74**	**-74.03**
139	L:9 L:51 H:114	SER ALA THR	LYS PRO ILE	**-20.73**	**-21.43**
140	L:9 L:80 H:114	SER PRO THR	ARG ALA SER	**-20.73**	**-72.9**
141	L:9 H:92 H:114	SER ALA THR	ARG GLY ASN	**-20.73**	**-65.47**
142	L:9 H:56 H:114	SER GLY THR	LYS VAL ILE	**-20.73**	**-71.64**
143	L:9 H:48 H:114	SER VAL THR	ARG LEU ASN	**-20.72**	**-76.27**

Figura 11C (Continuação)

144	L:9 H:61 H:114	SER ALA THR	LYS VAL ILE	**-20.71**	**-74.97**
145	L:9 H:16 H:114	SER GLY THR	ARG ALA SER	**-20.71**	**-70.28**
146	L:9 H:4 H:114	SER LEU THR	ARG VAL ASN	**-20.7**	**-63.71**
147	L:9 H:16 H:114	SER GLY THR	ARG ALA ILE	**-20.7**	**-81.88**
148	L:9 H:56 H:114	SER GLY THR	ARG VAL ASN	**-20.68**	**-80.26**
149	L:9 H:56 H:114	SER GLY THR	LYS VAL ASN	**-20.68**	**-64.37**
150	L:9 H:106 H:114	SER ALA THR	LYS GLY ILE	**-20.68**	**-65.31**
151	L:9 H:106 H:114	SER ALA THR	LYS VAL ASN	**-20.67**	**-67.65**
152	L:9 L:80 H:114	SER PRO THR	ARG ALA ILE	**-20.67**	**-82.75**
153	L:9 H:61 H:114	SER ALA THR	LYS VAL ASN	**-20.67**	**-67.66**
154	L:9 L:25 H:114	SER ALA THR	ARG VAL SER	**-20.66**	**-57.1**
155	L:9 H:114	SER THR	THR ILE	**-20.66**	**-81.4**
156	L:9 H:114	SER THR	ILE SER	**-20.65**	**-68.93**
157	L:9 H:48 H:114	SER VAL THR	LYS ILE ILE	**-20.64**	**-79.52**
158	L:9 L:101 H:114	SER GLY THR	LYS ALA ILE	**-20.63**	**-73.89**
159	L:9 H:106 H:114	SER ALA THR	ARG GLY ILE	**-20.62**	**-77.61**
160	L:9 H:4 H:114	SER LEU THR	ARG VAL ILE	**-20.62**	**-70.14**
161	L:9 L:32 H:114	SER ALA THR	ARG VAL ASN	**-20.62**	**-49.41**
162	L:9 L:43 H:114	SER ALA THR	LYS PRO ILE	**-20.61**	**-74.45**
163	L:9 H:2 H:114	SER VAL THR	LYS LEU ILE	**-20.6**	**-55.85**
164	L:9 L:89 H:114	SER GLN THR	LYS HID ASN	**-20.59**	**-62.74**

165	L:9 L:40 H:114	SER PRO THR	ARG SER ILE	**-20.57**	**-75.46**
166	L:9 L:76 H:114	SER SER THR	ARG ASN SER	**-20.57**	**-81.18**
167	L:9 L:40 H:114	SER PRO THR	ARG THR ILE	**-20.57**	**-73.45**
168	L:9 H:58 H:114	SER THR THR	ARG ILE SER	**-20.55**	**-70.24**
169	L:9 H:24 H:114	SER ALA THR	LYS PRO ILE	**-20.55**	**-44.78**

Figura 11C (Continuação)

Figura 11D

4 Mutações

Número	Resíduo	**Original**	Mutado	Δ Afinidade	Δ Estabilidade
1	L:9	SER	ARG	**-32.48**	**-47.75**
	L:43	ALA	PHE		
	H:26	GLY	ALA		
	H:58	THR	SER		
2	L:9	SER	ILE	**-31.91**	**-60.15**
	L:43	ALA	PHE		
	H:26	GLY	VAL		
	H:85	SER	ARG		
3	L:9	SER	ARG	**-31.54**	73.47
	L:43	ALA	PHE		
	H:24	ALA	PRO		
	H:61	ALA	VAL		
4	L:9	SER	THR	**-31.44**	61.87
	L:43	ALA	PHE		
	L:51	ALA	PRO		
	H:92	ALA	VAL		
5	L:9	SER	ILE	**-31.05**	**-53.04**
	L:43	ALA	PHE		
	L:101	GLY	ASP		
	H:79	ALA	VAL		
6	L:9	SER	ILE	**-31.02**	**-48.23**
	L:31	THR	SER		
	L:43	ALA	PHE		
	L:102	THR	SER		
7	L:9	SER	LYS	**-29.87**	**-5.55**
	L:43	ALA	PHE		
	L:51	ALA	SER		
	H:14	PRO	THR		
8	L:9	SER	ILE	**-29.74**	**-16.58**
	L:43	ALA	PHE		
	L:46	LEU	VAL		
	L:76	SER	ASN		
9	L:9	SER	ARG	**-29.36**	**-23.71**
	L:43	ALA	PHE		
	H:14	PRO	THR		
	H:88	ALA	VAL		
10	L:9	SER	THR	**-29.26**	**-4.8**
	L:43	ALA	PHE		
	L:101	GLY	ALA		
	H:79	ALA	GLY		
11	L:9	SER	ILE	**-28.95**	2.85
	L:43	ALA	PHE		
	L:102	THR	ASN		
	H:14	PRO	THR		
12	L:9	SER	ARG	**-28.55**	**-24.01**
	L:43	ALA	PHE		
	L:80	PRO	THR		
	H:61	ALA	ASP		
13	L:9	SER	ARG	**-28.1**	**-28.88**
	H:56	GLY	ALA		
	H:79	ALA	VAL		
	H:103	GLY	VAL		
14	L:9	SER	THR	**-26.36**	70.21
	H:92	ALA	VAL		
	H:103	GLY	VAL		
15	L:9	SER	ARG	**-26.27**	68.12
	H:92	ALA	VAL		
	H:103	GLY	VAL		

Figura 11D (Continuação)

16	L:9 H:56 H:92 H:103	SER GLY ALA GLY	ARG VAL VAL VAL	**-26.03**	62.68
17	L:9 L:89 H:92 H:103	SER GLN ALA GLY	ARG HID VAL VAL	**-25.68**	86.35
18	L:9 L:89 H:92 H:103	SER GLN ALA GLY	ARG HID GLY VAL	**-25.67**	82.6
19	L:9 L:43 H:92 H:103	SER ALA ALA GLY	LYS ASN VAL VAL	**-25.48**	66.08
20	L:9 H:92 H:103	SER ALA GLY	LYS GLY VAL	**-25.41**	70.24
21	L:9 H:92 H:103	SER ALA GLY	LYS VAL VAL	**-25.41**	73.99
22	L:9 L:76 H:92 H:103	SER SER ALA GLY	LYS ILE GLY VAL	**-25.39**	65.53
23	L:9 L:40 H:92 H:103	SER PRO ALA GLY	LYS SER GLY VAL	**-25.39**	82.76
24	L:9 H:88 H:92 H:103	SER ALA ALA GLY	LYS GLY VAL VAL	**-25.38**	77.03
25	L:9 L:80 H:92 H:103	SER PRO ALA GLY	LYS THR VAL VAL	**-25.37**	69
26	L:9 H:56 H:92 H:103	SER GLY ALA GLY	LYS VAL VAL VAL	**-25.37**	72.36
27	L:9 H:56 H:92 H:103	SER GLY ALA GLY	LYS VAL GLY VAL	**-25.36**	68.57
28	L:9 L:85 H:92 H:103	SER THR ALA GLY	LYS ILE GLY VAL	**-25.33**	64.14
29	L:9 H:14 H:92 H:103	SER PRO ALA GLY	ARG THR GLY VAL	**-25.33**	57.8
30	L:9 L:85 H:92 H:103	SER THR ALA GLY	LYS ILE VAL VAL	**-25.33**	70.03
31	L:9 H:88 H:92 H:103	SER ALA ALA GLY	LYS GLY GLY VAL	**-25.32**	73.34

Figura 11D (Continuação)

32	L:9 L:93 H:16 H:103	SER THR GLY GLY	LYS ILE VAL ALA	**-25.31**	**-52.18**
33	L:9 H:88 H:92 H:103	SER ALA ALA GLY	ARG GLY GLY VAL	**-25.31**	60.86
34	L:9 L:43 H:92 H:103	SER ALA ALA GLY	ARG ASN GLY VAL	**-25.3**	50.03
35	L:9 H:56 H:92 H:103	SER GLY ALA GLY	ARG VAL GLY VAL	**-25.3**	56.45
36	L:9 L:85 H:92 H:103	SER THR ALA GLY	ARG ILE GLY VAL	**-25.27**	51.96
37	L:9 H:4 H:92 H:103	SER LEU ALA GLY	LYS MET VAL VAL	**-25.26**	74.81
38	L:9 H:58 H:92 H:103	SER THR ALA GLY	LYS ILE VAL VAL	**-25.26**	75.35
39	L:9 L:85 H:92 H:103	SER THR ALA GLY	ARG ILE VAL VAL	**-25.24**	55.74
40	L:9 L:76 H:92 H:103	SER SER ALA GLY	LYS ASN VAL VAL	**-25.22**	70.92
41	L:9 H:24 H:92 H:103	SER ALA ALA GLY	LYS PHE VAL VAL	**-25.01**	95.86
42	L:9 H:24 H:92 H:103	SER ALA ALA GLY	LYS PHE GLY VAL	**-25**	92.16
43	L:9 H:24 H:92 H:103	SER ALA ALA GLY	ARG PHE GLY VAL	**-24.96**	78.74
44	L:9 H:2 H:92 H:103	SER VAL ALA GLY	LYS LEU VAL ALA	**-24.9**	74.08
45	L:9 H:2 H:103	SER VAL GLY	LYS LEU ALA	**-24.89**	59.87
46	L:9 H:2 H:92 H:103	SER VAL ALA GLY	LYS LEU GLY ALA	**-24.86**	69.88
47	L:9 H:3 H:56 H:103	SER GLN GLY GLY	ARG HID ALA VAL	**-24.85**	**-9.98**

Figura 11D (Continuação)

48	L:9 H:103 H:114	SER GLY THR	ARG VAL ASN	**-24.84**	**-19.23**
49	L:9 H:2 H:92 H:103	SER VAL ALA GLY	ARG LEU VAL ALA	**-24.84**	62.12
50	L:9 H:79 H:103	SER ALA GLY	LYS VAL VAL	**-24.84**	**-18.78**
51	L:9 L:47 H:3 H:103	SER LEU GLN GLY	ARG VAL HID VAL	**-24.84**	-1.82
52	L:9 H:3 H:103	SER GLN GLY	ARG HID VAL	**-24.82**	**-10.4**
53	L:9 H:56 H:103	SER GLY GLY	ARG ALA VAL	**-24.81**	**-15.76**
54	L:9 H:4 H:79 H:103	SER LEU ALA GLY	LYS MET GLY VAL	**-24.81**	0.51
55	L:9 L:101 H:3 H:103	SER GLY GLN GLY	ARG ALA HID VAL	**-24.79**	**-12.68**
56	L:9 L:76 H:92 H:103	SER SER ALA GLY	LYS ILE ASP VAL	**-24.77**	78.59
57	L:9 H:88 H:92 H:103	SER ALA ALA GLY	LYS GLY ASP VAL	**-24.76**	89.79
58	L:9 H:79 H:103	SER ALA GLY	ARG VAL VAL	**-24.75**	**-29.31**
59	L:9 L:101 H:103	SER GLY GLY	ARG ALA VAL	**-24.75**	**-18.08**
60	L:9 L:47 H:92 H:103	SER LEU ALA GLY	LYS VAL ASP VAL	**-24.74**	111.08
61	L:9 L:43 H:92 H:103	SER ALA ALA GLY	THR ASN VAL VAL	**-24.71**	59.03
62	L:9 H:4 H:79 H:103	SER LEU ALA GLY	LYS MET VAL VAL	**-24.7**	**-19.87**
63	L:9 L:85 H:92 H:103	SER THR ALA GLY	LYS ILE ASP VAL	**-24.7**	83.23
64	L:9 L:43 H:92 H:103	SER ALA ALA GLY	THR ASN GLY VAL	**-24.7**	55.27

Figura 11D (Continuação)

65	L:9 H:24 H:92 H:103	SER ALA ALA GLY	THR GLY VAL VAL	**-24.69**	76.82
66	L:9 H:79 H:85 H:103	SER ALA SER GLY	ARG GLY ARG ALA	**-24.68**	**-54.2**
67	L:9 L:85 H:92 H:103	SER THR ALA GLY	THR SER VAL VAL	**-24.67**	73.18
68	L:9 L:34 H:92 H:103	SER ALA ALA GLY	THR GLY VAL VAL	**-24.65**	77.6
69	L:9 L:85 H:92 H:103	SER THR ALA GLY	ARG ILE ASP VAL	**-24.64**	70.96
70	L:9 L:102 H:92 H:103	SER THR ALA GLY	THR ASN VAL VAL	**-24.64**	83.96
71	L:9 H:4 H:79 H:103	SER LEU ALA GLY	ARG MET VAL VAL	**-24.64**	**-30.61**
72	L:9 H:26 H:92 H:103	SER GLY ALA GLY	THR ALA VAL VAL	**-24.62**	72.5
73	L:9 H:14 H:92 H:103	SER PRO ALA GLY	THR ALA VAL VAL	**-24.61**	74.74
74	L:9 H:92 H:103 H:114	SER ALA GLY THR	THR VAL VAL ILE	**-24.61**	68.62
75	L:9 H:56 H:92 H:103	SER GLY ALA GLY	THR VAL VAL VAL	**-24.6**	65.31
76	L:9 H:85 H:103	SER SER GLY	ARG ARG ALA	**-24.6**	**-61.78**
77	L:9 H:14 H:92 H:103	SER PRO ALA GLY	THR ALA GLY VAL	**-24.6**	77.36
78	L:9 H:16 H:85 H:103	SER GLY SER GLY	LYS VAL ARG ALA	**-24.59**	**-52.03**
79	L:9 H:16 H:85 H:103	SER GLY SER GLY	ARG VAL ARG ALA	**-24.58**	**-64.84**
80	L:9 L:85 H:92 H:103	SER THR ALA GLY	ILE ILE GLY VAL	**-24.54**	55.22

Figura 11D (Continuação)

81	L:9 H:3 H:85 H:103	SER GLN SER GLY	LYS HID ARG ALA	**-24.53**	**-56.52**
82	L:9 H:85 H:103	SER SER GLY	LYS ARG ALA	**-24.5**	**-62.14**
83	L:9 L:76 H:85 H:103	SER SER SER GLY	LYS ILE ARG ALA	**-24.48**	**-72.72**
84	L:9 L:93 H:26 H:103	SER THR GLY GLY	LYS ILE ALA ALA	**-24.48**	56.08
85	L:9 H:85 H:103 H:114	SER SER GLY THR	LYS ARG ALA SER	**-24.46**	**-53.1**
86	L:9 H:61 H:92 H:103	SER ALA ALA GLY	ARG ASP GLY VAL	**-24.44**	64.17
87	L:9 H:92 H:103 H:114	SER ALA GLY THR	THR VAL ALA ILE	**-24.42**	51.32
88	L:9 H:85 H:103 H:114	SER SER GLY THR	ARG ARG ALA SER	**-24.38**	**-60.85**
89	L:9 H:16 H:103	SER GLY GLY	LYS VAL ALA	**-24.37**	**-45.25**
90	L:9 H:24 H:92 H:103	SER ALA ALA GLY	ARG PHE ASP VAL	**-24.33**	110.82
91	L:9 H:85 H:103 H:106	SER SER GLY ALA	ARG ARG ALA GLY	**-24.32**	**-54.91**
92	L:9 L:93 H:26 H:103	SER THR GLY GLY	THR ILE ALA ALA	**-24.29**	48.96
93	L:9 H:92 H:103	SER ALA GLY	LYS ASP VAL	**-24.22**	18.85
94	L:9 L:80 H:92 H:103	SER PRO ALA GLY	LYS THR ASP VAL	**-24.22**	14.57
95	L:9 H:24 H:92 H:103	SER ALA ALA GLY	ILE PHE VAL VAL	**-24.21**	86.99
96	L:9 H:103 H:114	SER GLY THR	ARG ALA SER	**-24.19**	**-52.86**

Figura 11D (Continuação)

97	L:9 H:58 H:85 H:103	SER THR SER GLY	ARG ILE ARG ALA	**-24.18**	**-61.95**
98	L:9 H:79 H:92 H:103	SER ALA ALA GLY	LYS VAL ASP VAL	**-24.17**	5.95
99	L:9 H:92 H:103	SER ALA GLY	THR VAL ALA	**-24.17**	52.92
100	L:9 H:24 H:85 H:103	SER ALA SER GLY	LYS ASN ARG ALA	**-24.16**	**-57.83**
101	L:9 H:79 H:92 H:103	SER ALA ALA GLY	THR VAL GLY VAL	**-24.15**	**-47.96**
102	L:9 L:93 H:26 H:103	SER THR GLY GLY	LYS ILE ASP ALA	**-24.14**	55.85
103	L:9 H:2 H:92 H:103	SER VAL ALA GLY	THR LEU VAL ALA	**-24.14**	67
104	L:9 H:3 H:56 H:103	SER GLN GLY GLY	ILE HID ALA VAL	**-24.12**	**-8.1**
105	L:9 L:25 H:92 H:103	SER ALA ALA GLY	ARG VAL GLY ALA	**-24.12**	34.13
106	L:9 H:24 H:85 H:103	SER ALA SER GLY	ARG ASN ARG ALA	**-24.09**	**-69.73**
107	L:9 H:92 H:103 H:106	SER ALA GLY ALA	THR VAL VAL VAL	**-24.07**	77.62
108	L:9 H:3 H:92 H:103	SER GLN ALA GLY	THR HID ASP VAL	**-24.06**	87.86
109	L:9 H:26 H:92 H:103	SER GLY ALA GLY	THR ALA ASP VAL	**-24.02**	84.67
110	L:9 H:92 H:103	SER ALA GLY	THR ASP VAL	**-24.02**	82.33
111	L:9 H:14 H:92 H:103	SER PRO ALA GLY	THR ALA ASP VAL	**-23.99**	87.75
112	L:9 L:76 H:92 H:103	SER SER ALA GLY	THR ILE ASP VAL	**-23.96**	71.75

Figura 11D (Continuação)

113	L:9 L:85 H:92 H:103	SER THR ALA GLY	THR ILE ASP VAL	**-23.94**	76.39
114	L:9 L:85 H:92 H:103	SER THR ALA GLY	ILE ILE ASP VAL	**-23.91**	74.55
115	L:9 H:4 H:79 H:103	SER LEU ALA GLY	ILE MET VAL VAL	**-23.91**	**-28.76**
116	L:9 L:31 H:103 H:114	SER THR GLY THR	ARG ASN VAL ASN	**-23.89**	**-13.7**
117	L:9 H:3 H:14 H:103	SER GLN PRO GLY	LYS HID THR VAL	**-23.87**	78.54
118	L:9 H:14 H:103	SER PRO GLY	LYS THR VAL	**-23.83**	73
119	L:9 L:31 H:103	SER THR GLY	ARG ASN VAL	**-23.82**	**-11.93**
120	L:9 L:34 H:14 H:103	SER ALA PRO GLY	LYS VAL THR VAL	**-23.81**	90.99
121	L:9 L:31 L:101 H:103	SER THR GLY GLY	ARG ASN ALA VAL	**-23.81**	**-12.59**
122	L:9 H:3 H:85 H:103	SER GLN SER GLY	THR HID ARG ALA	**-23.76**	**-63.67**
123	L:9 L:46 H:26 H:103	SER LEU GLY GLY	THR ILE ALA ALA	**-23.74**	69
124	L:9 H:61 H:92 H:103	SER ALA ALA GLY	THR ASP VAL VAL	**-23.73**	76.6
125	L:9 H:26 H:103	SER GLY GLY	THR ALA ALA	**-23.72**	54.88
126	L:9 H:88 H:92 H:103	SER ALA ALA GLY	THR ASP ASP VAL	**-23.7**	86.85
127	L:9 L:93 H:26 H:103	SER THR GLY GLY	ILE ILE ALA ALA	**-23.69**	47.1
128	L:9 L:93 H:26 H:103	SER THR GLY GLY	THR ILE VAL ALA	**-23.68**	48.26

Figura 11D (Continuação)

129	L:9 H:85 H:103 H:114	SER SER GLY THR	ILE ARG ALA SER	**-23.67**	**-62.25**
130	L:9 H:3 H:88 H:103	SER GLN ALA GLY	ARG HID VAL ALA	**-23.67**	**-52.39**
131	L:9 L:34 H:92 H:103	SER ALA ALA GLY	ARG VAL VAL ALA	**-23.65**	-1.63
132	L:9 L:31 H:103 H:106	SER THR GLY ALA	ARG ASN VAL VAL	**-23.62**	**-4.47**
133	L:9 L:101 H:16 H:103	SER GLY GLY GLY	LYS ASP ALA ALA	**-23.6**	**-40.42**
134	L:9 L:101 H:16 H:103	SER GLY GLY GLY	LYS ASP VAL ALA	**-23.6**	**-42.56**
135	L:9 H:3 H:92 H:103	SER GLN ALA GLY	ARG HID GLY ALA	**-23.56**	**-14.7**
136	L:9 H:26 H:92 H:103	SER GLY ALA GLY	ARG ALA VAL ALA	**-23.55**	**-14.96**
137	L:9 H:92 H:103	SER ALA GLY	ARG VAL ALA	**-23.55**	**-17.14**
138	L:9 L:93 H:92 H:103	SER THR ALA GLY	LYS ILE VAL ALA	**-23.53**	**-44.07**
139	L:9 H:92 H:103	SER ALA GLY	ARG GLY ALA	**-23.52**	**-20.47**
140	L:9 H:2 H:92 H:103	SER VAL ALA GLY	THR LEU ASP ALA	**-23.51**	80.07
141	L:9 L:93 H:2 H:103	SER THR VAL GLY	LYS ASN LEU ALA	**-23.51**	66.19
142	L:9 L:85 H:92 H:103	SER THR ALA GLY	ARG ILE VAL ALA	**-23.48**	**-23.63**
143	L:9 L:80 H:88 H:103	SER PRO ALA GLY	LYS ALA GLY ALA	**-23.47**	**-10.36**
144	L:9 H:79 H:92 H:103	SER ALA ALA GLY	ILE VAL ASP VAL	**-23.47**	**-26.24**

Figura 11D (Continuação)

145	L:9 H:48 H:92 H:103	SER VAL ALA GLY	ARG LEU GLY ALA	**-23.46**	**-15.99**
146	L:9 H:79 H:92 H:103	SER ALA ALA GLY	THR VAL ASP VAL	**-23.41**	-0.55
147	L:9 H:58 H:92 H:103	SER THR ALA GLY	LYS ILE VAL ALA	**-23.38**	-0.82
148	L:9 L:76 H:92 H:103	SER SER ALA GLY	ARG ASN VAL ALA	**-23.37**	**-20.12**
149	L:9 L:93 H:26 H:103	SER THR GLY GLY	THR ILE ASP ALA	**-23.37**	48.84
150	L:9 H:3 H:56 H:103	SER GLN GLY GLY	ARG HID ASP VAL	**-23.35**	**-7.22**
151	L:9 H:58 H:92 H:103	SER THR ALA GLY	ARG ILE VAL ALA	**-23.33**	**-12.31**
152	L:9 H:56 H:92 H:103	SER GLY ALA GLY	THR ASP VAL VAL	**-23.3**	72.99
153	L:9 H:24 H:92 H:103	SER ALA ALA GLY	ARG ASN VAL ALA	**-23.22**	**-12.64**
154	L:9 L:31 L:101 H:103	SER THR GLY GLY	ILE ASN ALA VAL	**-23.08**	**-8.89**
155	L:9 H:61 H:92 H:103	SER ALA ALA GLY	ARG VAL ASP VAL	**-23.07**	**-14.2**
156	L:9 H:58 H:92 H:103	SER THR ALA GLY	LYS SER ASP ALA	**-23.05**	18.98
157	L:9 H:92 H:103	SER ALA GLY	LYS ASP ALA	**-22.98**	13.03
158	L:9 H:24 H:92 H:103	SER ALA ALA GLY	ARG ASN GLY ALA	**-22.97**	**-19.38**
159	L:9 H:92 H:103	SER ALA GLY	ARG GLY VAL	**-22.97**	**-29.82**
160	L:9 H:3 H:92 H:103	SER GLN ALA GLY	ARG HID ASP ALA	**-22.95**	19.39

Figura 11D (Continuação)

161	L:9 H:92 H:103	SER ALA GLY	LYS VAL ALA	**-22.92**	**-38.05**
162	L:9 H:16 H:92 H:103	SER GLY ALA GLY	LYS ALA GLY VAL	**-22.92**	**-19.26**
163	L:9 H:92 H:103	SER ALA GLY	ARG ASP ALA	**-22.91**	13.64
164	L:9 H:92 H:103	SER ALA GLY	LYS GLY ALA	**-22.89**	**-43.34**
165	L:9 H:4 H:92 H:103	SER LEU ALA GLY	ARG VAL GLY VAL	**-22.86**	**-15.65**
166	L:9 H:16 H:92 H:103	SER GLY ALA GLY	ARG ALA GLY VAL	**-22.86**	**-31.55**
167	L:9 H:58 H:92 H:103	SER THR ALA GLY	ILE SER GLY ALA	**-22.85**	**-3.84**
168	L:9 H:58 H:92 H:103	SER THR ALA GLY	ILE SER VAL ALA	**-22.85**	**-5.21**
169	L:9 H:24 H:88 H:103	SER ALA ALA GLY	ARG GLY VAL ALA	**-22.84**	**-53.51**
170	L:9 L:76 H:92 H:103	SER SER ALA GLY	THR ASN VAL ALA	**-22.84**	**-14.9**
171	L:9 L:80 L:102 H:79	SER PRO THR ALA	LYS THR ILE VAL	**-22.83**	**-52.04**
172	L:9 H:24 H:85	SER ALA SER	ARG GLY ARG	**-22.82**	47.27
173	L:9 L:102 H:88 H:103	SER THR ALA GLY	ARG ASN GLY ALA	**-22.82**	**-41.36**
174	L:9 H:88 H:92 H:103	SER ALA ALA GLY	LYS GLY ASP ALA	**-22.82**	6.45
175	L:9 L:102 H:88 H:103	SER THR ALA GLY	ARG ASN VAL ALA	**-22.82**	**-47.74**
176	L:9 H:79 H:92 H:103	SER ALA ALA GLY	ILE VAL GLY VAL	**-22.82**	**-50.34**

Figura 11D (Continuação)

177	L:9 H:2 H:48 H:103	SER VAL VAL GLY	ARG LEU ILE VAL	**-22.81**	**-32.27**
178	L:9 H:88 H:92 H:103	SER ALA ALA GLY	LYS GLY GLY ALA	**-22.8**	**-40.92**
179	L:9 H:88 H:103	SER ALA GLY	ARG GLY ALA	**-22.8**	**-54.17**
180	L:9 H:58 H:92 H:103	SER THR ALA GLY	LYS ILE ASP ALA	**-22.79**	14.4
181	L:9 H:48 H:88 H:103	SER VAL ALA GLY	ARG LEU VAL ALA	**-22.79**	**-63.37**
182	L:9 H:4 H:92 H:103	SER LEU ALA GLY	LYS VAL GLY ALA	**-22.79**	**-29.18**
183	L:9 H:88 H:92 H:103	SER ALA ALA GLY	ARG GLY GLY ALA	**-22.79**	**-53.46**
184	L:9 H:88 H:103	SER ALA GLY	ARG VAL ALA	**-22.78**	**-60.38**
185	L:9 H:85 H:88 H:103	SER SER ALA GLY	ARG ARG GLY ALA	**-22.78**	**-33.12**
186	L:9 L:34 H:2 H:103	SER ALA VAL GLY	ARG GLY ILE ALA	**-22.78**	**-49.05**
187	L:9 H:92 H:103	SER ALA GLY	ILE VAL ALA	**-22.77**	**-11.16**
188	L:9 L:34 H:2 H:103	SER ALA VAL GLY	ARG GLY LEU ALA	**-22.76**	**-35.07**
189	L:9 L:85 H:92 H:103	SER THR ALA GLY	ILE ILE GLY ALA	**-22.75**	**-27.49**
190	L:9 L:85 H:92 H:103	SER THR ALA GLY	ILE ILE VAL ALA	**-22.74**	**-20.7**
191	L:9 H:2 H:103	SER VAL GLY	ARG ILE ALA	**-22.73**	**-56.48**
192	L:9 L:25 H:92 H:103	SER ALA ALA GLY	LYS ASP VAL VAL	**-22.72**	109.94

193	L:9 H:56 H:79 H:103	SER GLY ALA GLY	LYS ALA VAL ALA	**-22.67**	**-21.71**
194	L:9 H:88 H:103	SER ALA GLY	LYS GLY ALA	**-22.63**	**-14.02**
195	L:9 H:103 H:114	SER GLY THR	LYS ALA SER	**-22.63**	**-6.9**
196	L:9 H:88 H:103 H:114	SER ALA GLY THR	LYS GLY ALA SER	**-22.63**	**-3.96**
197	L:9 L:80 H:26 H:103	SER PRO GLY GLY	LYS SER ALA ALA	**-22.62**	**-15.29**

Figura 11D (Continuação)

Figura 11E

5 Mutações

Número	Resíduo	Original	Mutado	Δ Afinidade	Δ Estabilidade
	L:9	SER	ARG		
	L:43	ALA	PHE		
1	H:92	ALA	ASP	**-35.47**	21.7
	H:103	GLY	VAL		
	H:114	THR	ASN		
	L:9	SER	ARG		
	L:43	ALA	PHE		
2	H:88	ALA	GLY	**-32.78**	**-75.08**
	H:103	GLY	ALA		
	H:114	THR	ASN		
	L:9	SER	ILE		
	L:43	ALA	PHE		
3	H:85	SER	ARG	**-31.99**	**-73.44**
	H:103	GLY	ALA		
	H:114	THR	ILE		
	L:9	SER	ARG		
	L:43	ALA	PHE		
4	H:16	GLY	VAL	**-30.43**	9.38
	H:85	SER	ARG		
	H:114	THR	ILE		
	L:9	SER	ARG		
	L:43	ALA	PHE		
5	H:2	VAL	LEU	**-29.51**	**-60.66**
	H:14	PRO	SER		
	H:114	THR	ILE		
	L:9	SER	ARG		
	L:43	ALA	PHE		
6	H:16	GLY	ALA	**-29.09**	**-81.47**
	H:58	THR	ASN		
	H:114	THR	ILE		
	L:9	SER	ARG		
	L:93	THR	ILE		
7	H:92	ALA	GLY	**-25.78**	**-12.61**
	H:103	GLY	VAL		
	H:114	THR	ILE		
	L:9	SER	ARG		
	L:102	THR	ILE		
8	H:92	ALA	GLY	**-25.44**	7.33
	H:103	GLY	VAL		
	H:114	THR	SER		
	L:9	SER	LYS		
	L:51	ALA	THR		
9	H:92	ALA	VAL	**-25.4**	7.37
	H:103	GLY	VAL		
	H:114	THR	ASN		
	L:9	SER	ARG		
	H:48	VAL	PHE		
10	H:92	ALA	VAL	**-25.31**	114.9
	H:103	GLY	VAL		
	H:114	THR	ASN		
	L:9	SER	ARG		
	L:25	ALA	VAL		
11	H:92	ALA	ASP	**-25.3**	81.52
	H:103	GLY	VAL		
	H:114	THR	SER		
	L:9	SER	ARG		
	H:48	VAL	PHE		
12	H:92	ALA	VAL	**-25.27**	108.05
	H:103	GLY	VAL		
	H:114	THR	ILE		

Figura 11E (Continuação)

	L:9	SER	ARG		
	L:93	THR	ILE		
13	H:92	ALA	GLY	**-25.23**	**-13.15**
	H:103	GLY	VAL		
	H:114	THR	SER		
	L:9	SER	ARG		
	H:85	SER	ARG		
14	H:92	ALA	VAL	**-25.15**	**-23.8**
	H:103	GLY	VAL		
	H:114	THR	ASN		
	L:9	SER	ARG		
	L:80	PRO	THR		
15	H:92	ALA	GLY	**-25.09**	**-22.29**
	H:103	GLY	VAL		
	H:114	THR	ILE		
	L:9	SER	LYS		
	L:101	GLY	ALA		
16	H:92	ALA	GLY	**-25.07**	**-10.03**
	H:103	GLY	VAL		
	H:114	THR	ASN		
	L:9	SER	ARG		
	H:56	GLY	ALA		
17	H:79	ALA	VAL	**-25.03**	**-40.37**
	H:103	GLY	VAL		
	H:114	THR	ASN		
	L:9	SER	ARG		
	H:58	THR	SER		
18	H:92	ALA	VAL	**-25.01**	**-5.57**
	H:103	GLY	VAL		
	H:114	THR	ASN		
	L:9	SER	ARG		
	L:101	GLY	VAL		
19	H:92	ALA	VAL	**-24.99**	**-21.41**
	H:103	GLY	VAL		
	H:114	THR	ILE		
	L:9	SER	LYS		
	L:51	ALA	THR		
20	H:92	ALA	VAL	**-24.97**	11.01
	H:103	GLY	VAL		
	H:114	THR	SER		
	L:9	SER	ARG		
	L:80	PRO	ALA		
21	H:92	ALA	VAL	**-24.95**	1.03
	H:103	GLY	VAL		
	H:114	THR	ASN		
	L:9	SER	ARG		
22	H:92	ALA	VAL	**-24.94**	**-3.32**
	H:103	GLY	VAL		
	H:114	THR	SER		
	L:9	SER	ARG		
23	H:92	ALA	VAL	**-24.93**	**-11.42**
	H:103	GLY	VAL		
	H:114	THR	ASN		
	L:9	SER	ARG		
	L:80	PRO	THR		
24	H:92	ALA	VAL	**-24.93**	**-14.81**
	H:103	GLY	VAL		
	H:114	THR	ASN		
	L:9	SER	ARG		
	L:101	GLY	VAL		
25	H:92	ALA	VAL	**-24.93**	**-14.01**
	H:103	GLY	VAL		
	H:114	THR	ASN		

Figura 11E (Continuação)

26	L:9 L:101 H:92 H:103 H:114	SER GLY ALA GLY THR	ARG VAL VAL VAL SER	**-24.92**	**-11.41**
27	L:9 L:51 H:92 H:103 H:114	SER ALA ALA GLY THR	LYS THR GLY VAL SER	**-24.9**	9.21
28	L:9 H:48 H:92 H:103 H:114	SER VAL ALA GLY THR	ARG PHE VAL VAL SER	**-24.88**	118.53
29	L:9 H:92 H:103 H:114	SER ALA GLY THR	ARG VAL VAL ILE	**-24.87**	-0.53
30	L:9 H:61 H:103 H:114	SER ALA GLY THR	LYS GLY ALA ASN	**-24.86**	**-42.87**
31	L:9 L:80 H:92 H:103 H:114	SER PRO ALA GLY THR	ARG THR VAL VAL SER	**-24.86**	4.94
32	L:9 H:56 H:92 H:103 H:114	SER GLY ALA GLY THR	ARG ALA GLY VAL SER	**-24.86**	**-5.83**
33	L:9 H:92 H:103 H:114	SER ALA GLY THR	ARG GLY VAL SER	**-24.86**	**-6.2**
34	L:9 L:80 H:92 H:103 H:114	SER PRO ALA GLY THR	ARG THR GLY VAL SER	**-24.86**	**-10.58**
35	L:9 L:80 H:92 H:103 H:114	SER PRO ALA GLY THR	ARG THR VAL VAL ILE	**-24.85**	**-6.72**
36	L:9 H:26 H:92 H:103 H:114	SER GLY ALA GLY THR	ARG ALA VAL VAL ILE	**-24.85**	2.01
37	L:9 L:40 H:92 H:103 H:114	SER PRO ALA GLY THR	ARG ALA VAL VAL ILE	**-24.85**	4.58
38	L:9 H:92 H:103 H:114	SER ALA GLY THR	ARG GLY VAL ILE	**-24.84**	**-5.72**

Figura 11E (Continuação)

39	L:9 L:51 H:79 H:103 H:114	SER ALA ALA GLY THR	ARG PRO GLY VAL ASN	**-24.8**	3.96
40	L:9 H:2 H:92 H:103 H:114	SER VAL ALA GLY THR	ARG ILE GLY VAL SER	**-24.8**	**-8.78**
41	L:9 L:51 H:61 H:103 H:114	SER ALA ALA GLY THR	LYS PRO GLY ALA ASN	**-24.77**	**-20.92**
42	L:9 L:51 H:79 H:103 H:114	SER ALA ALA GLY THR	LYS PRO VAL VAL ASN	**-24.76**	**-2.89**
43	L:9 L:32 H:92 H:103 H:114	SER ALA ALA GLY THR	ARG VAL GLY VAL SER	**-24.75**	19.22
44	L:9 H:88 H:92 H:103 H:114	SER ALA ALA GLY THR	ARG GLY VAL VAL ASN	**-24.72**	**-3.63**
45	L:9 H:88 H:92 H:103 H:114	SER ALA ALA GLY THR	ARG GLY GLY VAL ASN	**-24.71**	**-19.57**
46	L:9 L:89 H:92 H:103 H:114	SER GLN ALA GLY THR	ARG HID VAL VAL ASN	**-24.71**	**-6.52**
47	L:9 L:51 H:26 H:103 H:114	SER ALA GLY GLY THR	LYS SER ALA VAL ASN	**-24.7**	**-11.4**
48	L:9 L:51 H:79 H:103 H:114	SER ALA ALA GLY THR	ARG PRO VAL VAL ASN	**-24.7**	**-15.23**
49	L:9 H:92 H:103 H:114	SER ALA GLY THR	LYS GLY VAL SER	**-24.7**	**-5.17**
50	L:9 H:24 H:61 H:103 H:114	SER ALA ALA GLY THR	LYS PRO VAL ALA ILE	**-24.7**	**-44.49**

Figura 11E (Continuação)

	L:9	SER	LYS		
	H:88	ALA	GLY		
51	H:92	ALA	VAL	**-24.68**	24.34
	H:103	GLY	VAL		
	H:114	THR	ASN		
	L:9	SER	LYS		
	H:92	ALA	VAL		
52	H:103	GLY	VAL	**-24.68**	21.38
	H:114	THR	ASN		
	L:9	SER	LYS		
	H:48	VAL	PHE		
53	H:92	ALA	GLY	**-24.67**	75.26
	H:103	GLY	VAL		
	H:114	THR	SER		
	L:9	SER	LYS		
	L:101	GLY	ALA		
54	H:92	ALA	GLY	**-24.67**	**-6.39**
	H:103	GLY	VAL		
	H:114	THR	SER		
	L:9	SER	LYS		
	H:14	PRO	ALA		
55	H:61	ALA	GLY	**-24.66**	**-36.74**
	H:103	GLY	ALA		
	H:114	THR	ASN		
	L:9	SER	ARG		
	H:26	GLY	VAL		
56	H:92	ALA	GLY	**-24.66**	**-13.58**
	H:103	GLY	VAL		
	H:114	THR	SER		
	L:9	SER	LYS		
	H:79	ALA	VAL		
57	H:92	ALA	VAL	**-24.66**	7.75
	H:103	GLY	VAL		
	H:114	THR	ASN		
	L:9	SER	LYS		
	L:46	LEU	ILE		
58	H:61	ALA	GLY	**-24.66**	**-42.3**
	H:103	GLY	ALA		
	H:114	THR	ASN		
	L:9	SER	LYS		
	L:46	LEU	ILE		
59	H:61	ALA	GLY	**-24.65**	**-39.69**
	H:103	GLY	ALA		
	H:114	THR	SER		
	L:9	SER	ARG		
	L:51	ALA	SER		
60	H:26	GLY	ALA	**-24.64**	**-23.69**
	H:103	GLY	VAL		
	H:114	THR	ASN		
	L:9	SER	LYS		
	L:51	ALA	SER		
61	H:26	GLY	ALA	**-24.62**	**-18.73**
	H:103	GLY	VAL		
	H:114	THR	ILE		
	L:9	SER	ARG		
	L:101	GLY	ALA		
62	H:92	ALA	GLY	**-24.62**	**-20.49**
	H:103	GLY	VAL		
	H:114	THR	ASN		
	L:9	SER	ARG		
	L:102	THR	ASN		
63	H:103	GLY	VAL	**-24.61**	**-9.85**
	H:114	THR	ASN		

Figura 11E (Continuação)

64	L:9 H:48 H:92 H:103 H:114	SER VAL ALA GLY THR	ARG PHE GLY VAL SER	**-24.61**	63.22
65	L:9 L:51 H:26 H:103 H:114	SER ALA GLY GLY THR	LYS SER VAL VAL ILE	**-24.6**	**-19.64**
66	L:9 L:102 H:26 H:103 H:114	SER THR GLY GLY THR	ARG ASN ALA VAL ASN	**-24.6**	**-7.84**
67	L:9 H:79 H:103 H:114	SER ALA GLY THR	ARG VAL VAL ASN	**-24.6**	**-39.78**
68	L:9 H:79 H:92 H:103 H:114	SER ALA ALA GLY THR	ARG VAL VAL VAL ASN	**-24.59**	**-3.99**
69	L:9 H:92 H:103 H:114	SER ALA GLY THR	ARG GLY VAL ASN	**-24.59**	**-17.28**
70	L:9 L:85 H:56 H:103 H:114	SER THR GLY GLY THR	ARG SER ALA VAL ILE	**-24.58**	**-27.72**
71	L:9 H:56 H:79 H:103 H:114	SER GLY ALA GLY THR	ARG ALA VAL VAL SER	**-24.58**	**-35.14**
72	L:9 L:43 H:92 H:103 H:114	SER ALA ALA GLY THR	ARG ASN VAL VAL ASN	**-24.57**	0.51
73	L:9 H:26 H:103 H:114	SER GLY GLY THR	ARG ALA VAL ASN	**-24.57**	**-22.13**
74	L:9 H:56 H:103 H:114	SER GLY GLY THR	ARG ALA VAL ILE	**-24.57**	**-34.36**
75	L:9 H:61 H:103 H:114	SER ALA GLY THR	LYS VAL ALA ASN	**-24.57**	**-50.23**
76	L:9 L:43 H:92 H:103 H:114	SER ALA ALA GLY THR	ARG PRO VAL VAL ASN	**-24.57**	6.46

Figura 11E (Continuação)

	L:9	SER	ARG		
	H:56	GLY	ALA		
77	H:79	ALA	VAL	**-24.57**	**-46.74**
	H:103	GLY	VAL		
	H:114	THR	ILE		
	L:9	SER	LYS		
	H:56	GLY	VAL		
78	H:58	THR	ILE	**-24.56**	**-57.89**
	H:103	GLY	ALA		
	H:114	THR	ILE		
	L:9	SER	LYS		
	H:14	PRO	ALA		
79	H:61	ALA	VAL	**-24.56**	**-44.15**
	H:103	GLY	ALA		
	H:114	THR	ASN		
	L:9	SER	ARG		
	L:51	ALA	SER		
80	H:26	GLY	ALA	**-24.56**	**-31.07**
	H:103	GLY	VAL		
	H:114	THR	ILE		
	L:9	SER	ARG		
	H:48	VAL	ILE		
81	H:92	ALA	GLY	**-24.55**	**-24.23**
	H:103	GLY	VAL		
	H:114	THR	ASN		
	L:9	SER	ARG		
	H:48	VAL	ILE		
82	H:92	ALA	VAL	**-24.54**	**-7.63**
	H:103	GLY	VAL		
	H:114	THR	ASN		
	L:9	SER	ARG		
	H:26	GLY	VAL		
83	H:56	GLY	ALA	**-24.54**	**-32.83**
	H:103	GLY	VAL		
	H:114	THR	ILE		
	L:9	SER	ARG		
	L:80	PRO	ALA		
84	H:92	ALA	VAL	**-24.53**	4.65
	H:103	GLY	VAL		
	H:114	THR	SER		
	L:9	SER	ARG		
	H:14	PRO	SER		
85	H:92	ALA	VAL	**-24.53**	17.99
	H:103	GLY	VAL		
	H:114	THR	SER		
	L:9	SER	ARG		
	L:43	ALA	PHE		
86	H:92	ALA	GLY	**-24.52**	3.89
	H:103	GLY	VAL		
	H:114	THR	ASN		
	L:9	SER	ARG		
	H:14	PRO	SER		
87	H:92	ALA	VAL	**-24.52**	6.38
	H:103	GLY	VAL		
	H:114	THR	ILE		
	L:9	SER	ARG		
	L:43	ALA	PHE		
88	H:92	ALA	VAL	**-24.51**	9.25
	H:103	GLY	VAL		
	H:114	THR	ASN		

Figura 11E (Continuação)

89	L:9 H:26 H:103 H:114	SER GLY GLY THR	ARG ALA VAL ILE	**-24.51**	**-32.32**
90	L:9 L:80 H:92 H:103 H:114	SER PRO ALA GLY THR	ARG THR ASP VAL ILE	**-24.5**	7.11
91	L:9 H:2 H:92 H:103 H:114	SER VAL ALA GLY THR	ARG ILE VAL VAL ASN	**-24.49**	**-2.12**
92	L:9 H:26 H:103 H:114	SER GLY GLY THR	ARG VAL VAL ILE	**-24.49**	**-33.23**
93	L:9 L:93 H:92 H:103 H:114	SER THR ALA GLY THR	ILE ILE GLY VAL ILE	**-24.48**	**-11.16**
94	L:9 L:25 H:61 H:103 H:114	SER ALA ALA GLY THR	LYS VAL VAL ALA ASN	**-24.46**	**-7.7**
95	L:9 H:26 H:103 H:114	SER GLY GLY THR	ARG ALA ALA ASN	**-24.45**	**-57.56**
96	L:9 H:92 H:103 H:114	SER ALA GLY THR	ILE VAL VAL SER	**-24.41**	5.45
97	L:9 H:58 H:92 H:103 H:114	SER THR ALA GLY THR	THR SER VAL VAL ILE	**-24.36**	**-7.65**
98	L:9 H:24 H:61 H:103 H:114	SER ALA ALA GLY THR	LYS PRO VAL ALA ASN	**-24.34**	**-36.72**
99	L:9 H:56 H:58 H:103 H:114	SER GLY THR GLY THR	LYS VAL ILE ALA SER	**-24.34**	**-46.16**
100	L:9 L:102 H:103 H:106 H:114	SER THR GLY ALA THR	LYS ASN VAL VAL ASN	**-24.34**	10.69
101	L:9 H:24 H:61 H:103 H:114	SER ALA ALA GLY THR	LYS PRO VAL ALA SER	**-24.33**	**-34.04**

Figura 11E (Continuação)

102	L:9 L:51 H:92 H:103 H:114	SER ALA ALA GLY THR	LYS THR ASP VAL SER	**-24.32**	26.27
103	L:9 L:102 H:103 H:106 H:114	SER THR GLY ALA THR	ARG ASN VAL VAL ASN	**-24.32**	**-2.3**
104	L:9 H:24 H:61 H:103 H:114	SER ALA ALA GLY THR	LYS PRO GLY ALA ILE	**-24.3**	**-36.39**
105	L:9 H:58 H:92 H:103 H:114	SER THR ALA GLY THR	THR SER VAL VAL ASN	**-24.3**	-0.25
106	L:9 H:24 H:92 H:103 H:114	SER ALA ALA GLY THR	THR GLY VAL VAL ASN	**-24.29**	-0.25
107	L:9 L:76 H:92 H:103 H:114	SER SER ALA GLY THR	ILE THR VAL ALA SER	**-24.29**	**-31.39**
108	L:9 L:80 H:92 H:103 H:114	SER PRO ALA GLY THR	ARG THR ASP VAL SER	**-24.27**	18.76
109	L:9 H:24 H:61 H:103 H:114	SER ALA ALA GLY THR	ARG PRO VAL ALA ILE	**-24.25**	**-56.18**
110	L:9 L:102 H:92 H:103 H:114	SER THR ALA GLY THR	THR ASN VAL VAL ASN	**-24.25**	8.02
111	L:9 H:92 H:103 H:114	SER ALA GLY THR	THR VAL VAL ASN	**-24.23**	**-6.04**
112	L:9 L:51 H:92 H:103 H:114	SER ALA ALA GLY THR	THR THR VAL VAL ASN	**-24.22**	1.46
113	L:9 H:58 H:88 H:103 H:114	SER THR ALA GLY THR	LYS ILE GLY ALA ILE	**-24.22**	**-52.96**

Figura 11E (Continuação)

114	L:9 H:58 H:103 H:114	SER THR GLY THR	LYS ILE ALA ILE	**-24.22**	**-55.9**
115	L:9 H:48 H:92 H:103 H:114	SER VAL ALA GLY THR	THR PHE VAL VAL ILE	**-24.19**	126.02
116	L:9 H:2 H:92 H:103 H:114	SER VAL ALA GLY THR	THR ILE VAL VAL ASN	**-24.19**	**-8.39**
117	L:9 L:43 H:92 H:103 H:114	SER ALA ALA GLY THR	THR ASN VAL VAL ASN	**-24.19**	**-13.87**
118	L:9 H:2 H:92 H:103 H:114	SER VAL ALA GLY THR	THR ILE GLY VAL ASN	**-24.18**	**-23.62**
119	L:9 H:24 H:92 H:103 H:114	SER ALA ALA GLY THR	ARG ASN VAL VAL SER	**-24.18**	6.15
120	L:9 L:80 H:92 H:103 H:114	SER PRO ALA GLY THR	THR THR VAL VAL SER	**-24.16**	8.3
121	L:9 H:79 H:92 H:103 H:114	SER ALA ALA GLY THR	ILE GLY GLY VAL SER	**-23.98**	0.84
122	L:9 H:92 H:103 H:114	SER ALA GLY THR	ILE GLY VAL SER	**-23.9**	**-6.97**
123	L:9 L:80 H:92 H:103 H:114	SER PRO ALA GLY THR	ILE THR GLY VAL SER	**-23.89**	**-12**
124	L:9 H:79 H:88 H:103 H:114	SER ALA ALA GLY THR	THR GLY GLY ALA ILE	**-23.8**	**-32.54**
125	L:9 H:79 H:92 H:103 H:114	SER ALA ALA GLY THR	ILE GLY ASP VAL ASN	**-23.77**	25.36
126	L:9 H:79 H:88 H:103 H:114	SER ALA ALA GLY THR	THR GLY GLY ALA ASN	**-23.76**	**-25.29**

Figura 11E (Continuação)

	L:9	SER	THR		
	L:25	ALA	VAL		
127	H:61	ALA	VAL	**-23.76**	**-14.8**
	H:103	GLY	ALA		
	H:114	THR	ASN		
	L:9	SER	LYS		
	H:14	PRO	ALA		
128	H:61	ALA	ASP	**-23.72**	**-36.88**
	H:103	GLY	ALA		
	H:114	THR	ASN		
	L:9	SER	THR		
	L:76	SER	THR		
129	H:92	ALA	VAL	**-23.69**	**-29.09**
	H:103	GLY	ALA		
	H:114	THR	SER		
	L:9	SER	THR		
	H:88	ALA	GLY		
130	H:92	ALA	VAL	**-23.67**	**-19.85**
	H:103	GLY	ALA		
	H:114	THR	SER		
	L:9	SER	THR		
131	H:92	ALA	VAL	**-23.67**	**-22.8**
	H:103	GLY	ALA		
	H:114	THR	SER		
	L:9	SER	ILE		
132	H:92	ALA	VAL	**-23.67**	**-24.63**
	H:103	GLY	ALA		
	H:114	THR	SER		
	L:9	SER	THR		
	H:88	ALA	GLY		
133	H:92	ALA	GLY	**-23.65**	**-22.83**
	H:103	GLY	ALA		
	H:114	THR	ASN		
	L:9	SER	ILE		
	H:26	GLY	VAL		
134	H:92	ALA	VAL	**-23.64**	**-23.01**
	H:103	GLY	ALA		
	H:114	THR	SER		
	L:9	SER	THR		
	H:88	ALA	GLY		
135	H:92	ALA	GLY	**-23.64**	**-20.28**
	H:103	GLY	ALA		
	H:114	THR	SER		
	L:9	SER	THR		
	H:88	ALA	GLY		
136	H:92	ALA	VAL	**-23.61**	**-24.4**
	H:103	GLY	ALA		
	H:114	THR	ILE		
	L:9	SER	ILE		
	H:26	GLY	ASP		
137	H:92	ALA	VAL	**-23.61**	**-6.38**
	H:103	GLY	VAL		
	H:114	THR	SER		
	L:9	SER	THR		
	H:14	PRO	THR		
138	H:88	ALA	GLY	**-23.6**	**-34.47**
	H:103	GLY	ALA		
	H:114	THR	ILE		
	L:9	SER	THR		
	H:88	ALA	GLY		
139	H:103	GLY	ALA	**-23.6**	**-40.38**
	H:114	THR	ILE		

Figura 11E (Continuação)

140	L:9 L:31 H:56 H:103 H:114	SER THR GLY GLY THR	ARG SER VAL ALA ILE	**-23.6**	**-64.89**
141	L:9 H:88 H:92 H:103 H:114	SER ALA ALA GLY THR	THR GLY GLY ALA ILE	**-23.58**	**-30.18**
142	L:9 H:26 H:92 H:103 H:114	SER GLY ALA GLY THR	ILE ASP GLY VAL SER	**-23.57**	**-6.67**
143	L:9 H:58 H:88 H:103 H:114	SER THR ALA GLY THR	ILE ILE GLY ALA ILE	**-23.43**	**-61.68**
144	L:9 L:43 H:92 H:103 H:114	SER ALA ALA GLY THR	ILE ASN ASP VAL ASN	**-23.41**	10.69
145	L:9 H:79 H:92 H:103 H:114	SER ALA ALA GLY THR	ILE GLY ASP VAL SER	**-23.38**	29.08
146	L:9 L:76 H:92 H:103 H:114	SER SER ALA GLY THR	ILE THR ASP VAL ASN	**-23.3**	12.29
147	L:9 H:92 H:103 H:114	SER ALA GLY THR	ILE ASP VAL ASN	**-23.3**	18.73
148	L:9 L:76 H:92 H:103 H:114	SER SER ALA GLY THR	ILE THR ASP VAL SER	**-23.29**	14.83
149	L:9 L:51 H:56 H:103 H:114	SER ALA GLY GLY THR	ARG PRO VAL ALA ILE	**-23.18**	**-34.67**
150	L:9 H:58 H:88 H:103 H:114	SER THR ALA GLY THR	THR ILE ASP ALA ILE	**-23.14**	**-59.75**
151	L:9 L:93 H:24 H:58 H:114	SER THR ALA THR THR	LYS ILE PRO ILE ILE	**-23.13**	**-36.78**

Figura 11E (Continuação)

	L:9	SER	ILE		
	H:58	THR	ILE		
152	H:88	ALA	ASP	**-23.11**	**-61.51**
	H:103	GLY	ALA		
	H:114	THR	ILE		
	L:9	SER	THR		
	H:88	ALA	GLY		
153	H:92	ALA	ASP	**-23.04**	5.79
	H:103	GLY	ALA		
	H:114	THR	ASN		
	L:9	SER	LYS		
	H:2	VAL	ILE		
154	H:58	THR	ASN	**-22.92**	**-63.41**
	H:103	GLY	ALA		
	H:114	THR	ASN		
	L:9	SER	ARG		
	L:51	ALA	PRO		
155	H:56	GLY	VAL	**-22.83**	**-26.68**
	H:103	GLY	ALA		
	H:114	THR	ASN		
	L:9	SER	ARG		
	L:51	ALA	PRO		
156	H:56	GLY	VAL	**-22.82**	**-24.1**
	H:103	GLY	ALA		
	H:114	THR	SER		
	L:9	SER	LYS		
	L:102	THR	ILE		
157	H:24	ALA	GLY	**-22.79**	**-62.42**
	H:103	GLY	ALA		
	H:114	THR	ILE		
	L:9	SER	ARG		
	L:51	ALA	PRO		
158	H:56	GLY	ALA	**-22.69**	**-31.89**
	H:103	GLY	ALA		
	H:114	THR	ILE		
	L:9	SER	ARG		
159	H:56	GLY	VAL	**-22.69**	**-73.38**
	H:103	GLY	ALA		
	H:114	THR	ILE		
	L:9	SER	ARG		
	L:101	GLY	VAL		
160	L:102	THR	ILE	**-22.64**	**-64.67**
	H:103	GLY	ALA		
	H:114	THR	SER		
	L:9	SER	LYS		
	H:4	LEU	VAL		
161	H:56	GLY	ALA	**-22.61**	**-47.9**
	H:103	GLY	ALA		
	H:114	THR	ILE		
	L:9	SER	ILE		
	L:101	GLY	VAL		
162	L:102	THR	ILE	**-22.61**	**-65.92**
	H:103	GLY	ALA		
	H:114	THR	SER		
	L:9	SER	LYS		
	H:56	GLY	ALA		
163	H:58	THR	ASN	**-22.6**	**-69.41**
	H:103	GLY	ALA		
	H:114	THR	ILE		
	L:9	SER	ARG		
164	H:56	GLY	ALA	**-22.58**	**-72.48**
	H:103	GLY	ALA		
	H:114	THR	ILE		

Figura 11E (Continuação)

165	L:9 L:102 H:24 H:103 H:114	SER THR ALA GLY THR	LYS ILE GLY ALA SER	**-22.57**	**-50.72**
166	L:9 H:56 H:58 H:103 H:114	SER GLY THR GLY THR	LYS ALA ASN ALA ASN	**-22.56**	**-62**
167	L:9 H:4 H:56 H:103 H:114	SER LEU GLY GLY THR	ARG VAL ALA ALA ILE	**-22.54**	**-59.48**
168	L:9 L:32 L:93 L:101 H:114	SER ALA THR GLY THR	ARG VAL ASN ALA ASN	**-22.53**	**-53.88**
169	L:9 L:31 H:56 H:103 H:114	SER THR GLY GLY THR	ARG SER ALA ALA ILE	**-22.52**	**-65.69**
170	L:9 H:58 H:103 H:114	SER THR GLY THR	LYS ASN ALA ASN	**-22.48**	**-62.49**
171	L:9 L:102 H:58 H:103 H:114	SER THR THR GLY THR	LYS ASN ASN ALA ILE	**-22.4**	**-55.98**
172	L:9 H:58 H:103 H:114	SER THR GLY THR	LYS ASN ALA ILE	**-22.38**	**-70.02**
173	L:9 H:24 H:56 H:103 H:114	SER ALA GLY GLY THR	ARG PHE VAL ALA ILE	**-22.36**	24.42
174	L:9 L:102 H:24 H:103 H:114	SER THR ALA GLY THR	LYS ILE PHE ALA SER	**-22.29**	35.91
175	L:9 H:4 H:56 H:103 H:114	SER LEU GLY GLY THR	THR VAL ALA ALA ILE	**-22.27**	**-55.67**
176	L:9 L:25 H:58 H:103 H:114	SER ALA THR GLY THR	LYS GLY ASN ALA ILE	**-22.1**	**-60.35**
177	L:9 H:56 H:103 H:114	SER GLY GLY THR	THR ALA ALA ASN	**-22.06**	**-58.43**

Figura 11E (Continuação)

	L:9	SER	ARG		
	L:34	ALA	GLY		
178	L:93	THR	ASN	**-22.02**	**-61.28**
	H:88	ALA	GLY		
	H:114	THR	ILE		
	L:9	SER	THR		
	L:101	GLY	VAL		
179	L:102	THR	SER	**-22.02**	**-57.14**
	H:103	GLY	ALA		
	H:114	THR	SER		
	L:9	SER	LYS		
	H:2	VAL	ILE		
180	H:58	THR	ASN	**-21.98**	**-59.74**
	H:103	GLY	ALA		
	H:114	THR	SER		
	L:9	SER	LYS		
	H:2	VAL	ILE		
181	H:58	THR	ASN	**-21.97**	**-71.38**
	H:103	GLY	ALA		
	H:114	THR	ILE		
	L:9	SER	THR		
	L:101	GLY	VAL		
182	L:102	THR	ILE	**-21.94**	**-58.27**
	H:103	GLY	ALA		
	H:114	THR	SER		
	L:9	SER	THR		
	L:101	GLY	VAL		
183	L:102	THR	ASN	**-21.94**	**-53.19**
	H:103	GLY	ALA		
	H:114	THR	SER		
	L:9	SER	THR		
184	H:79	ALA	GLY	**-21.93**	**-22.74**
	H:88	ALA	GLY		
	H:114	THR	ASN		
	L:9	SER	THR		
	H:4	LEU	VAL		
185	H:56	GLY	ALA	**-21.91**	**-47.7**
	H:103	GLY	ALA		
	H:114	THR	ASN		
	L:9	SER	THR		
	H:4	LEU	VAL		
186	H:56	GLY	ALA	**-21.9**	**-45.12**
	H:103	GLY	ALA		
	H:114	THR	SER		
	L:9	SER	THR		
187	H:56	GLY	ALA	**-21.9**	**-68.29**
	H:103	GLY	ALA		
	H:114	THR	ILE		
	L:9	SER	THR		
	L:43	ALA	GLY		
188	L:102	THR	SER	**-21.88**	**-65.93**
	H:103	GLY	ALA		
	H:114	THR	ILE		
	L:9	SER	THR		
	L:31	THR	SER		
189	H:56	GLY	VAL	**-21.87**	**-63.44**
	H:103	GLY	ALA		
	H:114	THR	ILE		
	L:9	SER	THR		
190	H:56	GLY	ALA	**-21.87**	**-56.66**
	H:103	GLY	ALA		
	H:114	THR	SER		

Figura 11E (Continuação)

	L:9	SER	THR		
	L:43	ALA	GLY		
191	L:102	THR	SER	**-21.85**	**-58.54**
	H:103	GLY	ALA		
	H:114	THR	ASN		
	L:9	SER	THR		
	H:26	GLY	ALA		
192	H:61	ALA	VAL	**-21.83**	**-66.04**
	H:103	GLY	ALA		
	H:114	THR	ASN		
	L:9	SER	THR		
	H:26	GLY	ALA		
193	H:61	ALA	VAL	**-21.82**	**-63.47**
	H:103	GLY	ALA		
	H:114	THR	SER		
	L:9	SER	THR		
	H:61	ALA	VAL		
194	H:103	GLY	ALA	**-21.82**	**-66.93**
	H:114	THR	ASN		
	L:9	SER	THR		
	L:102	THR	ILE		
195	H:24	ALA	GLY	**-21.8**	**-58.27**
	H:103	GLY	ALA		
	H:114	THR	SER		
	L:9	SER	THR		
	L:43	ALA	GLY		
196	L:102	THR	ASN	**-21.8**	**-53.97**
	H:103	GLY	ALA		
	H:114	THR	ASN		
	L:9	SER	THR		
	L:102	THR	ILE		
197	H:24	ALA	GLY	**-21.79**	**-69.89**
	H:103	GLY	ALA		
	H:114	THR	ILE		
	L:9	SER	THR		
	L:102	THR	SER		
198	H:61	ALA	VAL	**-21.79**	**-59.4**
	H:103	GLY	ALA		
	H:114	THR	ASN		
	L:9	SER	THR		
	H:2	VAL	ILE		
199	H:58	THR	ASN	**-21.78**	**-70.94**
	H:103	GLY	ALA		
	H:114	THR	ASN		

Figura 11F

6 Mutações

Número	Resíduo	Original	Mutado	Δ Afinidade	Δ Estabilidade
1	L:9	SER	LYS	-38.89	65.02
	L:25	ALA	GLY		
	H:24	ALA	ASN		
	H:56	GLY	ALA		
	H:92	ALA	VAL		
	H:106	ALA	VAL		
2	L:9	SER	LYS	-37.52	-1.22
	L:40	PRO	THR		
	L:43	ALA	PHE		
	H:16	GLY	VAL		
	H:85	SER	ARG		
	H:103	GLY	VAL		
3	L:9	SER	THR	-29.14	-29.16
	L:43	ALA	PHE		
	L:46	LEU	VAL		
	L:80	PRO	ALA		
	L:93	THR	SER		
	H:3	GLN	HID		
4	L:9	SER	ARG	-28.58	-15.8
	L:47	LEU	VAL		
	L:51	ALA	THR		
	H:48	VAL	ILE		
	H:58	THR	SER		
	H:103	GLY	VAL		
5	L:9	SER	LYS	-28.22	39.26
	L:40	PRO	ALA		
	L:43	ALA	ASN		
	L:46	LEU	VAL		
	H:92	ALA	VAL		
	H:103	GLY	VAL		
6	L:9	SER	LYS	-28.22	39.26
	L:40	PRO	ALA		
	L:43	ALA	ASN		
	L:46	LEU	VAL		
	H:92	ALA	VAL		
	H:103	GLY	VAL		
7	L:9	SER	LYS	-28.02	0.05
	L:51	ALA	THR		
	L:102	THR	SER		
	H:16	GLY	ALA		
	H:92	ALA	VAL		
	H:103	GLY	VAL		
8	L:9	SER	LYS	-27.93	16.17
	L:89	GLN	HID		
	L:102	THR	SER		
	H:16	GLY	ALA		
	H:92	ALA	GLY		
	H:103	GLY	VAL		
9	L:9	SER	LYS	-27.92	20.59
	L:89	GLN	HID		
	L:102	THR	SER		
	H:16	GLY	ALA		
	H:92	ALA	VAL		
	H:103	GLY	VAL		
10	L:9	SER	LYS	-27.91	1.39
	L:89	GLN	HID		
	H:16	GLY	ALA		
	H:48	VAL	LEU		
	H:92	ALA	GLY		
	H:103	GLY	VAL		

Figura 11F (Continuação)

11	L:9 L:89 L:102 H:16 H:92 H:103	SER GLN THR GLY ALA GLY	LYS HID ILE ALA VAL VAL	**-27.87**	24.48
12	L:9 L:89 H:16 H:92 H:103	SER GLN GLY ALA GLY	LYS HID ALA GLY VAL	**-27.86**	6.53
13	L:9 L:43 L:76 H:92 H:103	SER ALA SER ALA GLY	ARG ASN ASN VAL VAL	**-27.69**	1.95
14	L:9 L:47 L:51 H:48 H:58 H:103	SER LEU ALA VAL THR GLY	ARG VAL PRO LEU SER VAL	**-27.69**	23.87
15	L:9 L:85 L:102 H:58 H:92 H:103	SER THR THR THR ALA GLY	ARG SER ILE SER GLY VAL	**-27.69**	**-3.14**
16	L:9 L:102 H:58 H:92 H:103	SER THR THR ALA GLY	ARG ILE SER GLY VAL	**-27.68**	**-10.06**
17	L:9 L:102 H:48 H:58 H:92 H:103	SER THR VAL THR ALA GLY	ARG ILE ILE SER GLY VAL	**-27.67**	**-17.6**
18	L:9 L:32 L:43 H:92 H:103	SER ALA ALA ALA GLY	ARG VAL ASN VAL VAL	**-27.65**	29.95
19	L:9 L:32 L:43 H:88 H:92 H:103	SER ALA ALA ALA ALA GLY	ARG VAL ASN VAL VAL VAL	**-27.65**	27.22
20	L:9 L:85 L:102 H:92 H:103	SER THR THR ALA GLY	ARG SER ILE GLY VAL	**-27.65**	**-8.58**
21	L:9 L:47 L:51 H:58 H:103	SER LEU ALA THR GLY	ARG VAL PRO SER VAL	**-27.65**	28.9

Figura 11F (Continuação)

22	L:9	SER	ARG	**-27.64**	24.67
	L:32	ALA	VAL		
	L:43	ALA	ASN		
	L:80	PRO	THR		
	H:92	ALA	VAL		
	H:103	GLY	VAL		
23	L:9	SER	ARG	**-27.64**	-1.97
	L:40	PRO	SER		
	L:85	THR	SER		
	L:102	THR	ILE		
	H:92	ALA	GLY		
	H:103	GLY	VAL		
24	L:9	SER	ARG	**-27.63**	21.43
	L:47	LEU	VAL		
	L:51	ALA	PRO		
	H:48	VAL	ILE		
	H:58	THR	SER		
	H:103	GLY	VAL		
25	L:9	SER	ARG	**-27.63**	**-23.04**
	L:102	THR	ILE		
	H:48	VAL	ILE		
	H:92	ALA	GLY		
	H:103	GLY	VAL		
26	L:9	SER	LYS	**-27.62**	**-13.68**
	H:16	GLY	ALA		
	H:48	VAL	LEU		
	H:58	THR	SER		
	H:92	ALA	GLY		
	H:103	GLY	VAL		
27	L:9	SER	LYS	**-27.61**	-0.24
	L:102	THR	SER		
	H:16	GLY	ALA		
	H:92	ALA	VAL		
	H:103	GLY	VAL		
28	L:9	SER	ARG	**-27.6**	12.84
	L:80	PRO	SER		
	H:16	GLY	ALA		
	H:92	ALA	VAL		
	H:103	GLY	VAL		
29	L:9	SER	ARG	**-27.6**	8.08
	L:31	THR	ASN		
	L:32	ALA	VAL		
	H:85	SER	ARG		
	H:103	GLY	VAL		
30	L:9	SER	ARG	**-27.6**	**-3.99**
	L:40	PRO	SER		
	L:102	THR	ILE		
	H:92	ALA	GLY		
	H:103	GLY	VAL		
31	L:9	SER	ARG	**-27.59**	7.25
	L:51	ALA	PRO		
	H:48	VAL	LEU		
	H:58	THR	SER		
	H:103	GLY	VAL		
32	L:9	SER	ARG	**-27.59**	14.15
	H:16	GLY	ALA		
	H:26	GLY	ALA		
	H:92	ALA	VAL		
	H:103	GLY	VAL		

Figura 11F (Continuação)

33	L:9 L:80 H:16 H:26 H:92 H:103	SER PRO GLY GLY ALA GLY	ARG SER ALA ALA VAL VAL	**-27.59**	12.87
34	L:9 L:102 H:48 H:61 H:92 H:103	SER THR VAL ALA ALA GLY	ARG ILE ILE VAL GLY VAL	**-27.59**	**-25.3**
35	L:9 L:51 H:48 H:58 H:92 H:103	SER ALA VAL THR ALA GLY	ARG PRO LEU SER GLY VAL	**-27.59**	9
36	L:9 H:16 H:48 H:92 H:103	SER GLY VAL ALA GLY	LYS ALA LEU GLY VAL	**-27.58**	**-19.13**
37	L:9 H:48 H:58 H:92 H:103	SER VAL THR ALA GLY	ARG LEU SER GLY VAL	**-27.58**	**-23.11**
38	L:9 L:40 L:43 L:46 H:92 H:103	SER PRO ALA LEU ALA GLY	LYS ALA ASN VAL ASP VAL	**-27.58**	52.88
39	L:9 L:43 L:101 H:92 H:103	SER ALA GLY ALA GLY	LYS PHE VAL GLY VAL	**-27.58**	**-15.08**
40	L:9 H:48 H:58 H:92 H:103	SER VAL THR ALA GLY	LYS ILE ASN VAL VAL	**-27.57**	**-19.84**
41	L:9 H:48 H:61 H:92 H:103	SER VAL ALA ALA GLY	ARG ILE VAL GLY VAL	**-27.57**	**-38.17**
42	L:9 L:25 L:43 L:76 H:92 H:103	SER ALA ALA SER ALA GLY	ARG VAL ASN ASN VAL VAL	**-27.57**	33.37
43	L:9 H:16 H:48 H:58 H:92 H:103	SER GLY VAL THR ALA GLY	ARG ALA LEU SER GLY VAL	**-27.57**	**-25.7**

Figura 11F (Continuação)

44	L:9 L:80 H:48 H:58 H:92 H:103	SER PRO VAL THR ALA GLY	LYS ALA ILE ASN VAL VAL	**-27.56**	**-16.79**
45	L:9 L:40 L:85 L:102 H:92 H:103	SER PRO THR THR ALA GLY	ARG SER ILE ILE GLY VAL	**-27.55**	**-14.5**
46	L:9 L:32 H:16 H:26 H:92 H:103	SER ALA GLY GLY ALA GLY	ARG VAL ALA ALA VAL VAL	**-27.55**	38.96
47	L:9 L:32 L:80 H:92 H:103	SER ALA PRO ALA GLY	ARG VAL THR VAL VAL	**-27.55**	32.64
48	L:9 L:32 H:16 H:92 H:103	SER ALA GLY ALA GLY	ARG VAL ALA VAL VAL	**-27.54**	36.11
49	L:9 L:40 L:85 H:48 H:103	SER PRO THR VAL GLY	LYS ALA ILE PHE VAL	**-27.54**	-0.62
50	L:9 L:32 L:80 H:16 H:92 H:103	SER ALA PRO GLY ALA GLY	ARG VAL THR ALA VAL VAL	**-27.54**	30.8
51	L:9 L:43 L:102 H:92 H:103	SER ALA THR ALA GLY	ARG PHE ASN GLY VAL	**-27.52**	**-14.35**
52	L:9 L:40 L:43 L:46 H:92 H:103	SER PRO ALA LEU ALA GLY	ARG ALA ASN VAL ASP VAL	**-27.52**	40.44
53	L:9 L:80 H:48 H:58 H:92 H:103	SER PRO VAL THR ALA GLY	ARG ALA ILE ASN VAL VAL	**-27.51**	**-28.38**
54	L:9 L:43 L:101 H:4 H:92 H:103	SER ALA GLY LEU ALA GLY	LYS PHE VAL MET GLY VAL	**-27.48**	**-10.11**

Figura 11F (Continuação)

55	L:9 L:32 L:43 L:76 H:92 H:103	SER ALA ALA SER ALA GLY	ARG VAL ASN ASN VAL VAL	**-27.46**	26.87
56	L:9 L:80 H:48 H:61 H:103 H:114	SER PRO VAL ALA GLY THR	LYS SER LEU GLY VAL SER	**-27.44**	**-5.02**
57	L:9 L:32 L:43 L:51 H:92 H:103	SER ALA ALA ALA ALA GLY	LYS VAL PRO SER GLY VAL	**-27.44**	**-11.48**
58	L:9 L:40 L:43 L:46 H:92 H:103	SER PRO ALA LEU ALA GLY	ILE ALA ASN VAL VAL VAL	**-27.43**	29.85
59	L:9 L:102 H:58 H:92 H:103	SER THR THR ALA GLY	ARG ASN ILE GLY VAL	**-27.43**	**-7.56**
60	L:9 L:40 L:85 H:4 H:48 H:103	SER PRO THR LEU VAL GLY	LYS ALA ILE MET PHE VAL	**-27.42**	-1.61
61	L:9 L:32 L:43 L:51 H:92 H:103	SER ALA ALA ALA ALA GLY	LYS VAL PRO SER VAL VAL	**-27.42**	**-6.93**
62	L:9 L:40 L:102 H:58 H:92 H:103	SER PRO THR THR ALA GLY	ARG SER ASN ILE GLY VAL	**-27.42**	-0.96
63	L:9 L:40 L:102 H:58 H:92 H:103	SER PRO THR THR ALA GLY	ARG SER ILE ILE GLY VAL	**-27.42**	**-2.22**
64	L:9 L:40 L:102 H:58 H:92 H:103	SER PRO THR THR ALA GLY	ARG SER ASN ILE VAL VAL	**-27.41**	3.47

Figura 11F (Continuação)

65	L:9 L:80 H:48 H:61 H:103	SER PRO VAL ALA GLY	LYS SER LEU GLY VAL	**-27.4**	**-14.41**
66	L:9 L:31 H:48 H:92 H:103	SER THR VAL ALA GLY	ARG SER ILE GLY VAL	**-27.39**	**-30.88**
67	L:9 H:48 H:61 H:103 H:114	SER VAL ALA GLY THR	LYS PHE GLY VAL SER	**-27.39**	11.61
68	L:9 L:80 H:16 H:24 H:92 H:103	SER PRO GLY ALA ALA GLY	ARG SER ALA ASN VAL VAL	**-27.39**	25.61
69	L:9 L:80 H:48 H:61 H:103 H:114	SER PRO VAL ALA GLY THR	LYS SER PHE GLY VAL SER	**-27.38**	10.35
70	L:9 L:34 L:40 H:48 H:103	SER ALA PRO VAL GLY	LYS VAL SER PHE VAL	**-27.38**	12.2
71	L:9 L:34 L:40 L:43 H:48 H:103	SER ALA PRO ALA VAL GLY	LYS VAL SER PRO PHE VAL	**-27.37**	8.42
72	L:9 L:31 H:48 H:61 H:92 H:103	SER THR VAL ALA ALA GLY	ARG SER ILE VAL GLY VAL	**-27.36**	**-33**
73	L:9 L:34 L:40 L:85 H:48 H:103	SER ALA PRO THR VAL GLY	LYS VAL SER ILE PHE VAL	**-27.36**	6.78
74	L:9 L:80 H:48 H:92 H:103	SER PRO VAL ALA GLY	LYS ALA ILE VAL VAL	**-27.36**	**-17.32**
75	L:9 L:43 L:102 H:58 H:92 H:103	SER ALA THR THR ALA GLY	ARG PHE ASN ILE GLY VAL	**-27.35**	**-12.66**

Figura 11F (Continuação)

76	L:9 L:76 L:80 H:48 H:103	SER SER PRO VAL GLY	LYS THR SER LEU VAL	**-27.35**	**-23.57**
77	L:9 L:40 L:43 L:46 H:92 H:103	SER PRO ALA LEU ALA GLY	ARG ALA PHE VAL ASP VAL	**-27.34**	43.12
78	L:9 L:76 L:80 L:85 H:48 H:103	SER SER PRO THR VAL GLY	LYS THR SER ASN LEU VAL	**-27.33**	**-21.75**
79	L:9 L:40 L:43 H:92 H:103	SER PRO ALA ALA GLY	ILE ALA ASN VAL VAL	**-27.33**	13.27
80	L:9 L:31 H:48 H:58 H:92 H:103	SER THR VAL THR ALA GLY	LYS SER ILE ASN GLY VAL	**-27.33**	**-18.94**
81	L:9 L:34 L:40 L:43 H:48 H:103	SER ALA PRO ALA VAL GLY	LYS VAL SER PRO ILE VAL	**-27.33**	**-8.88**
82	L:9 L:34 L:40 L:43 H:48 H:103	SER ALA PRO ALA VAL GLY	LYS VAL ALA PRO ILE VAL	**-27.33**	**-8.83**
83	L:9 L:40 L:43 H:92 H:103	SER PRO ALA ALA GLY	LYS ALA PHE ASP VAL	**-27.33**	38.79
84	L:9 L:31 H:48 H:58 H:92 H:103	SER THR VAL THR ALA GLY	LYS SER ILE ASN VAL VAL	**-27.33**	**-14.67**
85	L:9 L:40 L:43 H:2 H:92 H:103	SER PRO ALA VAL ALA GLY	ILE ALA ASN ILE VAL VAL	**-27.31**	11.37
86	L:9 L:80 H:48 H:92 H:103	SER PRO VAL ALA GLY	ARG ALA ILE VAL VAL	**-27.31**	**-28.91**

Figura 11F (Continuação)

87	L:9 L:34 L:40 L:85 H:48 H:103	SER ALA PRO THR VAL GLY	LYS VAL ALA ILE PHE VAL	**-27.3**	6.82
88	L:9 L:43 H:3 H:92 H:103	SER ALA GLN ALA GLY	ILE ASN HID VAL VAL	**-27.29**	11.32
89	L:9 L:31 H:48 H:58 H:92 H:103	SER THR VAL THR ALA GLY	ARG SER ILE ASN GLY VAL	**-27.28**	**-30.63**
90	L:9 L:40 L:43 H:3 H:92 H:103	SER PRO ALA GLN ALA GLY	ILE ALA ASN HID VAL VAL	**-27.28**	18.03
91	L:9 L:40 L:43 H:92 H:103	SER PRO ALA ALA GLY	ARG ALA PHE ASP VAL	**-27.27**	26.34
92	L:9 L:51 L:102 H:92 H:103	SER ALA THR ALA GLY	ILE THR SER GLY VAL	**-27.26**	**-10.74**
93	L:9 L:25 L:34 L:101 H:92 H:103	SER ALA ALA GLY ALA GLY	ILE GLY VAL ALA GLY VAL	**-27.26**	**-5.16**
94	L:9 L:51 L:102 H:92 H:103	SER ALA THR ALA GLY	ILE THR SER VAL VAL	**-27.25**	**-6.31**
95	L:9 L:51 L:102 H:16 H:92 H:103	SER ALA THR GLY ALA GLY	ILE THR SER ALA VAL VAL	**-27.24**	**-8.9**
96	L:9 L:40 L:102 H:26 H:92 H:103	SER PRO THR GLY ALA GLY	ARG SER ILE ASP GLY VAL	**-27.23**	**-3.17**
97	L:9 L:25 L:40 L:43 H:92 H:103	SER ALA PRO ALA ALA GLY	LYS VAL ALA PHE ASP VAL	**-27.21**	69.91

Figura 11F (Continuação)

98	L:9 L:46 H:61 H:79 H:103 H:114	SER LEU ALA ALA GLY THR	ARG ILE GLY GLY VAL ASN	**-27.17**	2.38
99	L:9 L:43 L:47 L:51 H:58 H:103	SER ALA LEU ALA THR GLY	THR ASN VAL THR SER VAL	**-27.17**	**-14.19**
100	L:9 L:25 L:40 L:43 H:92 H:103	SER ALA PRO ALA ALA GLY	ARG VAL ALA PHE ASP VAL	**-27.15**	57.48
101	L:9 L:43 L:46 H:61 H:103 H:114	SER ALA LEU ALA GLY THR	ARG ASN ILE VAL VAL ASN	**-27.14**	**-20.43**
102	L:9 L:46 H:61 H:79 H:103 H:114	SER LEU ALA ALA GLY THR	ARG ILE VAL GLY VAL ASN	**-27.13**	**-4.64**
103	L:9 L:43 L:46 L:80 H:61 H:103	SER ALA LEU PRO ALA GLY	LYS ASN ILE SER VAL VAL	**-27.11**	**-8.25**
104	L:9 L:80 H:24 H:61 H:92 H:103	SER PRO ALA ALA ALA GLY	ILE SER PHE GLY VAL VAL	**-27.11**	190.19
105	L:9 L:80 H:48 H:103 H:114	SER PRO VAL GLY THR	LYS SER PHE VAL ASN	**-27.09**	0.7
106	L:9 L:34 L:80 H:48 H:92 H:103	SER ALA PRO VAL ALA GLY	ARG VAL ALA ILE VAL VAL	**-27.09**	**-19.97**
107	L:9 L:80 H:48 H:92 H:103 H:114	SER PRO VAL ALA GLY THR	LYS SER PHE VAL VAL ASN	**-27.08**	7.67

Figura 11F (Continuação)

108	L:9 L:47 L:51 H:58 H:103	SER LEU ALA THR GLY	THR VAL THR SER VAL	**-27.07**	**-6.22**
109	L:9 L:43 L:46 H:61 H:103	SER ALA LEU ALA GLY	ARG ASN ILE VAL VAL	**-27.06**	**-18.58**
110	L:9 L:43 L:46 L:80 H:61 H:103	SER ALA LEU PRO ALA GLY	ARG ASN ILE SER VAL VAL	**-27.06**	**-19.84**
111	L:9 L:47 L:51 H:48 H:58 H:103	SER LEU ALA VAL THR GLY	THR VAL THR ILE SER VAL	**-27.05**	**-13.69**
112	L:9 L:46 H:61 H:103 H:114	SER LEU ALA GLY THR	ARG ILE VAL VAL ASN	**-27.04**	**-12.6**
113	L:9 L:25 L:80 H:48 H:92 H:103	SER ALA PRO VAL ALA GLY	ARG GLY SER PHE VAL VAL	**-27.04**	-0.64
114	L:9 L:46 H:61 H:103 H:114	SER LEU ALA GLY THR	ARG ILE GLY VAL ASN	**-27.03**	**-5.96**
115	L:9 L:43 L:80 H:61 H:103	SER ALA PRO ALA GLY	LYS ASN SER VAL VAL	**-27.03**	**-21.94**
116	L:9 L:80 H:48 H:92 H:103 H:114	SER PRO VAL ALA GLY THR	ARG SER PHE VAL VAL ASN	**-27.03**	**-3.91**
117	L:9 L:43 L:47 H:79 H:103 H:114	SER ALA LEU ALA GLY THR	THR ASN VAL GLY VAL SER	**-27.02**	**-2.42**
118	L:9 L:80 H:48 H:88 H:92 H:103	SER PRO VAL ALA ALA GLY	ARG ALA ILE ASP VAL VAL	**-27.01**	**-29.42**

Figura 11F (Continuação)

119	L:9 L:25 L:80 H:92 H:103	SER ALA PRO ALA GLY	ARG GLY SER VAL VAL	**-27.01**	**-15.68**
120	L:9 L:25 L:80 H:92 H:103	SER ALA PRO ALA GLY	ARG GLY ALA VAL VAL	**-27.01**	**-11.32**
121	L:9 L:80 L:89 H:24 H:92 H:103	SER PRO GLN ALA ALA GLY	ARG SER HID ASN VAL VAL	**-27**	34.17
122	L:9 H:16 H:48 H:58 H:92 H:103	SER GLY VAL THR ALA GLY	LYS ALA LEU SER ASP VAL	**-27**	19.68
123	L:9 L:43 L:47 H:79 H:103	SER ALA LEU ALA GLY	THR ASN VAL GLY VAL	**-26.99**	**-11.87**
124	L:9 L:46 L:101 H:61 H:103 H:114	SER LEU GLY ALA GLY THR	ARG ILE VAL GLY VAL ASN	**-26.98**	**-6.88**
125	L:9 L:25 L:80 L:93 H:92 H:103	SER ALA PRO THR ALA GLY	ARG GLY ALA SER VAL VAL	**-26.98**	**-9.2**
126	L:9 L:43 L:47 H:58 H:103 H:114	SER ALA LEU THR GLY THR	THR ASN VAL SER VAL SER	**-26.97**	**-4.88**
127	L:9 L:43 L:47 H:48 H:79 H:103	SER ALA LEU VAL ALA GLY	THR ASN VAL ILE GLY VAL	**-26.97**	**-19.34**
128	L:9 L:80 H:48 H:92 H:103	SER PRO VAL ALA GLY	ARG SER PHE VAL VAL	**-26.97**	**-9.61**
129	L:9 L:43 L:80 H:61 H:103	SER ALA PRO ALA GLY	LYS GLY SER VAL VAL	**-26.97**	**-9.64**

Figura 11F (Continuação)

130	L:9 L:51 L:76 L:80 L:101 H:103	SER ALA SER PRO GLY GLY	LYS SER THR SER ASP VAL	**-26.96**	**-19.77**
131	L:9 L:25 L:43 L:76 H:92 H:103	SER ALA ALA SER ALA GLY	ARG VAL ASN ASN ASP VAL	**-26.96**	46.25
132	L:9 L:43 H:3 H:103 H:106	SER ALA GLN GLY ALA	ILE ASN HID VAL VAL	**-26.94**	11.01
133	L:9 L:43 H:3 H:24 H:103 H:106	SER ALA GLN ALA GLY ALA	ILE ASN HID PHE VAL VAL	**-26.94**	7.36
134	L:9 L:43 L:47 H:103 H:114	SER ALA LEU GLY THR	THR ASN VAL VAL SER	**-26.94**	**-10.37**
135	L:9 L:25 L:43 L:76 H:92 H:103	SER ALA ALA SER ALA GLY	ARG VAL PRO ASN ASP VAL	**-26.85**	50.46
136	L:9 L:25 L:43 H:92 H:103	SER ALA ALA ALA GLY	ARG VAL PRO ASP VAL	**-26.84**	53.4
137	L:9 L:40 L:43 L:46 H:92 H:103	SER PRO ALA LEU ALA GLY	THR ALA ASN VAL ASP VAL	**-26.81**	45.8
138	L:9 L:43 H:3 H:92 H:103 H:106	SER ALA GLN ALA GLY ALA	ILE ASN HID VAL VAL VAL	**-26.79**	18.85
139	L:9 L:80 H:24 H:61 H:92 H:103	SER PRO ALA ALA ALA GLY	THR SER ASN GLY VAL VAL	**-26.77**	39.56

Figura 11F (Continuação)

140	L:9 L:80 H:24 H:61 H:92 H:103	SER PRO ALA ALA ALA GLY	ILE SER ASN GLY VAL VAL	**-26.74**	37.47
141	L:9 L:43 H:3 H:48 H:103 H:106	SER ALA GLN VAL GLY ALA	ILE ASN HID PHE VAL VAL	**-26.71**	117.37
142	L:9 L:80 H:24 H:92 H:103	SER PRO ALA ALA GLY	THR SER ASN VAL VAL	**-26.7**	33.42
143	L:9 L:51 L:85 H:79 H:103	SER ALA THR ALA GLY	ARG SER ILE GLY ALA	**-26.69**	5.9
144	L:9 L:102 H:2 H:48 H:103 H:114	SER THR VAL VAL GLY THR	ARG ASN ILE LEU VAL ASN	**-26.51**	42.72
145	L:9 L:31 L:80 H:24 H:92 H:103	SER THR PRO ALA ALA GLY	ARG ASN SER ASN VAL VAL	**-26.48**	33.67
146	L:9 L:43 L:51 L:85 H:79 H:103	SER ALA ALA THR ALA GLY	ARG ASN SER ILE GLY ALA	**-26.29**	**-2.22**
147	L:9 L:46 L:51 L:85 H:79 H:103	SER LEU ALA THR ALA GLY	ARG VAL SER ILE GLY ALA	**-26.25**	22.64
148	L:9 L:25 L:43 L:93 H:92 H:103	SER ALA ALA THR ALA GLY	LYS VAL PHE ASN ASP VAL	**-26.22**	69.47
149	L:9 L:51 L:85 H:14 H:79 H:103	SER ALA THR PRO ALA GLY	LYS SER ILE SER GLY ALA	**-26.19**	26.7

Figura 11F (Continuação)

150	L:9 L:51 L:85 H:14 H:79 H:103	SER ALA THR PRO ALA GLY	ARG SER ILE SER GLY ALA	**-26.18**	14.17
151	L:9 L:43 L:85 H:14 H:103 H:106	SER ALA THR PRO GLY ALA	LYS ASN ILE SER VAL GLY	**-26.08**	48.55
152	L:9 L:43 L:85 H:103 H:106	SER ALA THR GLY ALA	LYS ASN ILE VAL GLY	**-26.08**	40.27
153	L:9 L:101 H:88 H:92 H:103 H:114	SER GLY ALA ALA GLY THR	LYS ALA VAL VAL VAL ASN	**-26**	9.4
154	L:9 L:43 L:85 H:24 H:103 H:106	SER ALA THR ALA GLY ALA	LYS ASN ILE PRO VAL GLY	**-25.98**	63.87
155	L:9 L:51 L:85 H:79 H:103	SER ALA THR ALA GLY	ARG THR ILE GLY ALA	**-25.96**	15.38
156	L:9 L:43 L:93 H:92 H:103	SER ALA THR ALA GLY	LYS PHE ASN ASP VAL	**-25.92**	38.36
157	L:9 H:2 H:48 H:92 H:103 H:114	SER VAL VAL ALA GLY THR	ARG ILE LEU VAL VAL ASN	**-25.92**	36.49
158	L:9 H:2 H:48 H:103 H:114	SER VAL VAL GLY THR	ARG ILE LEU VAL ASN	**-25.91**	26.05
159	L:9 L:40 L:43 L:93 H:92 H:103	SER PRO ALA THR ALA GLY	LYS ALA PHE ASN ASP VAL	**-25.9**	45.1
160	L:9 L:43 L:85 H:24 H:103 H:106	SER ALA THR ALA GLY ALA	LYS ASN ILE PRO ALA GLY	**-25.9**	49.78

Figura 11F (Continuação)

161	L:9 L:25 L:43 L:93 H:92 H:103	SER ALA ALA THR ALA GLY	LYS VAL PRO ASN ASP VAL	**-25.86**	71.07
162	L:9 H:2 H:48 H:92 H:103	SER VAL VAL ALA GLY	ARG ILE LEU VAL VAL	**-25.85**	37.97
163	L:9 L:80 H:2 H:48 H:92 H:103	SER PRO VAL VAL ALA GLY	ARG SER ILE LEU VAL VAL	**-25.85**	36.69
164	L:9 L:25 L:43 L:93 H:92 H:103	SER ALA ALA THR ALA GLY	ARG VAL GLY ASN ASP VAL	**-25.84**	66.82
165	L:9 L:85 H:14 H:79 H:103	SER THR PRO ALA GLY	LYS ILE SER GLY ALA	**-25.84**	32.49
166	L:9 L:43 L:85 H:14 H:103 H:106	SER ALA THR PRO GLY ALA	LYS ASN ILE SER ALA GLY	**-25.83**	32.37
167	L:9 L:85 H:14 H:79 H:103 H:106	SER THR PRO ALA GLY ALA	LYS ILE SER GLY ALA GLY	**-25.81**	40.8
168	L:9 L:25 L:43 L:93 H:92 H:103	SER ALA ALA THR ALA GLY	ARG VAL PRO ASN ASP VAL	**-25.8**	58.69
169	L:9 L:85 H:24 H:92 H:103	SER THR ALA ALA GLY	LYS ILE PRO GLY ALA	**-25.78**	59.84
170	L:9 L:85 H:24 H:103 H:106	SER THR ALA GLY ALA	LYS ILE PRO ALA GLY	**-25.78**	57.94
171	L:9 L:85 H:24 H:92 H:103 H:106	SER THR ALA ALA GLY ALA	LYS ILE PRO GLY ALA GLY	**-25.76**	68.1

Figura 11F (Continuação)

172	L:9 L:85 H:14 H:103 H:106	SER THR PRO GLY ALA	LYS ILE SER ALA GLY	**-25.73**	32.89
173	L:9 L:85 H:14 H:103 H:106 H:114	SER THR PRO GLY ALA THR	LYS ILE SER ALA GLY SER	**-25.72**	42.98
174	L:9 L:40 L:85 H:14 H:103 H:106	SER PRO THR PRO GLY ALA	LYS SER ILE SER ALA GLY	**-25.71**	39.62
175	L:9 L:76 L:85 H:14 H:103 H:106	SER SER THR PRO GLY ALA	LYS ILE ILE SER ALA GLY	**-25.68**	22.3
176	L:9 L:85 H:24 H:58 H:92 H:103	SER THR ALA THR ALA GLY	LYS ILE PRO ASN GLY ALA	**-25.6**	61.71
177	L:9 L:46 H:26 H:88 H:103 H:106	SER LEU GLY ALA GLY ALA	LYS ILE ASP GLY VAL GLY	**-25.59**	22.05
178	L:9 L:46 L:85 H:24 H:58 H:103	SER LEU THR ALA THR GLY	LYS ILE ILE ASN ASN ALA	**-25.57**	46.88
179	L:9 H:24 H:48 H:92 H:103	SER ALA VAL ALA GLY	ARG ASN LEU VAL VAL	**-25.56**	41.78
180	L:9 L:46 L:85 H:24 H:58 H:103	SER LEU THR ALA THR GLY	ARG ILE ILE ASN ASN ALA	**-25.56**	34.36
181	L:9 L:85 H:24 H:58 H:103	SER THR ALA THR GLY	LYS ILE ASN ASN ALA	**-25.55**	32.65
182	L:9 L:85 H:24 H:58 H:92 H:103	SER THR ALA THR ALA GLY	LYS ILE ASN ASN GLY ALA	**-25.55**	39.26

Figura 11F (Continuação)

183	L:9 H:3 H:26 H:48 H:103	SER GLN GLY VAL GLY	LYS HID ALA ILE ALA	**-25.5**	66.26
184	L:9 H:24 H:48 H:79 H:92 H:103	SER ALA VAL ALA ALA GLY	ARG ASN LEU VAL VAL VAL	**-25.5**	29.66
185	L:9 L:46 L:85 H:24 H:103	SER LEU THR ALA GLY	ARG ILE ASN ASN ALA	**-25.48**	45.43
186	L:9 L:46 L:85 H:24 H:58 H:103	SER LEU THR ALA THR GLY	ARG ILE ASN ASN ASN ALA	**-25.47**	47.52
187	L:9 H:24 H:26 H:48 H:103	SER ALA GLY VAL GLY	LYS PRO ALA PHE ALA	**-25.44**	144.15
188	L:9 H:3 H:24 H:26 H:48 H:103	SER GLN ALA GLY VAL GLY	LYS HID PRO ALA ILE ALA	**-25.4**	91.26
189	L:9 H:3 H:24 H:26 H:48 H:103	SER GLN ALA GLY VAL GLY	LYS HID PRO ALA PHE ALA	**-25.4**	149.66
190	L:9 L:25 H:24 H:92 H:103 H:106	SER ALA ALA ALA GLY ALA	ARG GLY ASN VAL ALA VAL	**-25.39**	49.6
191	L:9 L:25 H:24 H:103 H:106	SER ALA ALA GLY ALA	ARG GLY ASN ALA VAL	**-25.37**	42.92
192	L:9 L:25 L:46 H:24 H:103 H:106	SER ALA LEU ALA GLY ALA	ARG GLY ILE ASN ALA VAL	**-25.36**	56.72
193	L:9 L:51 L:102 H:2 H:103 H:114	SER ALA THR VAL GLY THR	THR PRO ASN LEU VAL ASN	**-25.32**	82.73

Figura 11F (Continuação)

194	L:9 L:46 H:24 H:103 H:106	SER LEU ALA GLY ALA	ARG ILE ASN ALA VAL	**-25.31**	46.14
195	L:9 H:2 H:24 H:48 H:92 H:103	SER VAL ALA VAL ALA GLY	ARG ILE ASN LEU VAL VAL	**-25.28**	40.29
196	L:9 L:43 L:101 H:92 H:103	SER ALA GLY ALA GLY	ARG PHE VAL VAL VAL	**-25.24**	**-4.24**
197	L:9 L:102 H:2 H:48 H:103 H:114	SER THR VAL VAL GLY THR	THR ASN ILE LEU VAL ASN	**-25.22**	45.28
198	L:9 L:46 L:85 H:24 H:58 H:103	SER LEU THR ALA THR GLY	ARG ILE ASN ASN ILE ALA	**-25.21**	45.46
199	L:9 L:102 H:2 H:103 H:114	SER THR VAL GLY THR	THR ASN LEU VAL ASN	**-25.19**	47.81
200	L:9 L:102 H:2 H:48 H:103 H:114	SER THR VAL VAL GLY THR	THR ASN LEU LEU VAL ASN	**-25.17**	59.94

Figura 12

Número	Resíduo	Original	Mutado	Δ Afinidade	Δ Estabilidade	# Mutações
1	L:9	SER	ARG	-32.78	-75.08	5
	L:43	ALA	PHE			
	H:88	ALA	GLY			
	H:103	GLY	ALA			
	H:114	THR	ASN			
2	L:9	SER	ARG	-32.48	-47.75	4
	L:43	ALA	PHE			
	H:26	GLY	ALA			
	H:58	THR	SER			
3	L:9	SER	ILE	-31.99	-73.44	5
	L:43	ALA	PHE			
	H:85	SER	ARG			
	H:103	GLY	ALA			
	H:114	THR	ILE			
4	L:9	SER	ILE	-31.91	-60.15	4
	L:43	ALA	PHE			
	H:26	GLY	VAL			
	H:85	SER	ARG			
5	L:9	SER	ARG	-31.23	-36.46	3
	L:43	ALA	PHE			
	H:114	THR	SER			
6	L:9	SER	ILE	-31.05	-53.04	4
	L:43	ALA	PHE			
	L:101	GLY	ASP			
	H:79	ALA	VAL			
7	L:9	SER	ILE	-31.02	-48.23	4
	L:31	THR	SER			
	L:43	ALA	PHE			
	L:102	THR	SER			
8	L:9	SER	THR	-30.47	-78.74	3
	L:43	ALA	PHE			
	H:114	THR	ASN			
9	L:9	SER	THR	-29.97	-76.82	3
	L:43	ALA	PHE			
	H:114	THR	ILE			
10	L:9	SER	LYS	-29.87	-5.55	4
	L:43	ALA	PHE			
	L:51	ALA	SER			
	H:14	PRO	THR			
11	L:9	SER	ILE	-29.74	-16.58	4
	L:43	ALA	PHE			
	L:46	LEU	VAL			
	L:76	SER	ASN			
12	L:9	SER	ARG	-29.51	-60.66	5
	L:43	ALA	PHE			
	H:2	VAL	LEU			
	H:14	PRO	SER			
	H:114	THR	ILE			
13	L:9	SER	ARG	-29.36	-23.71	4
	L:43	ALA	PHE			
	H:14	PRO	THR			
	H:88	ALA	VAL			
14	L:9	SER	THR	-29.26	-4.8	4
	L:43	ALA	PHE			
	L:101	GLY	ALA			
	H:79	ALA	GLY			

Figura 12 (Continuação)

15	L:9 L:43 L:46 L:80 L:93 H:3	SER ALA LEU PRO THR GLN	THR PHE VAL ALA SER HID	**-29.14**	**-29.16**	6
16	L:9 L:43 H:16 H:58 H:114	SER ALA GLY THR THR	ARG PHE ALA ASN ILE	**-29.09**	**-81.47**	5
17	L:9 L:47 L:51 H:48 H:58 H:103	SER LEU ALA VAL THR GLY	ARG VAL THR ILE SER VAL	**-28.58**	**-15.8**	6
18	L:9 L:43 L:80 H:61	SER ALA PRO ALA	ARG PHE THR ASP	**-28.55**	**-24.01**	4
19	L:9 L:43 H:106	SER ALA ALA	LYS PHE VAL	**-28.37**	**-45.98**	3
20	L:9 H:56 H:79 H:103	SER GLY ALA GLY	ARG ALA VAL VAL	**-28.1**	**-28.88**	4
21	L:9 L:85 L:102 H:58 H:92 H:103	SER THR THR THR ALA GLY	ARG SER ILE SER GLY VAL	**-27.69**	**-3.14**	6
22	L:9 L:102 H:58 H:92 H:103	SER THR THR ALA GLY	ARG ILE SER GLY VAL	**-27.68**	**-10.06**	5
23	L:9 L:102 H:48 H:58 H:92 H:103	SER THR VAL THR ALA GLY	ARG ILE ILE SER GLY VAL	**-27.67**	**-17.6**	6
24	L:9 L:85 L:102 H:92 H:103	SER THR THR ALA GLY	ARG SER ILE GLY VAL	**-27.65**	**-8.58**	5
25	L:9 L:102 H:48 H:92 H:103	SER THR VAL ALA GLY	ARG ILE ILE GLY VAL	**-27.63**	**-23.04**	5
26	L:9 H:16 H:48 H:58 H:92 H:103	SER GLY VAL THR ALA GLY	LYS ALA LEU SER GLY VAL	**-27.62**	**-13.68**	6

Figura 12 (Continuação)

27	L:9 L:40 L:102 H:92 H:103	SER PRO THR ALA GLY	ARG SER ILE GLY VAL	**-27.6**	**-3.99**	5
28	L:9 L:102 H:48 H:61 H:92 H:103	SER THR VAL ALA ALA GLY	ARG ILE ILE VAL GLY VAL	**-27.59**	**-25.3**	6
29	L:9 H:16 H:48 H:92 H:103	SER GLY VAL ALA GLY	LYS ALA LEU GLY VAL	**-27.58**	**-19.13**	5
30	L:9 H:48 H:58 H:92 H:103	SER VAL THR ALA GLY	ARG LEU SER GLY VAL	**-27.58**	**-23.11**	5
31	L:9 L:43 L:101 H:92 H:103	SER ALA GLY ALA GLY	LYS PHE VAL GLY VAL	**-27.58**	**-15.08**	5
32	L:9 H:48 H:58 H:92 H:103	SER VAL THR ALA GLY	LYS ILE ASN VAL VAL	**-27.57**	**-19.84**	5
33	L:9 H:48 H:61 H:92 H:103	SER VAL ALA ALA GLY	ARG ILE VAL GLY VAL	**-27.57**	**-38.17**	5
34	L:9 H:16 H:48 H:58 H:92 H:103	SER GLY VAL THR ALA GLY	ARG ALA LEU SER GLY VAL	**-27.57**	**-25.7**	6
35	L:9 L:80 H:48 H:58 H:92 H:103	SER PRO VAL THR ALA GLY	LYS ALA ILE ASN VAL VAL	**-27.56**	**-16.79**	6
36	L:9 L:40 L:85 L:102 H:92 H:103	SER PRO THR THR ALA GLY	ARG SER ILE ILE GLY VAL	**-27.55**	**-14.5**	6
37	L:9 L:43 L:102 H:92 H:103	SER ALA THR ALA GLY	ARG PHE ASN GLY VAL	**-27.52**	**-14.35**	5

Figura 12 (Continuação)

38	L:9 L:80 H:48 H:58 H:92 H:103	SER PRO VAL THR ALA GLY	ARG ALA ILE ASN VAL VAL	**-27.51**	**-28.38**	6
39	L:9 L:43 L:101 H:4 H:92 H:103	SER ALA GLY LEU ALA GLY	LYS PHE VAL MET GLY VAL	**-27.48**	**-10.11**	6
40	L:9 L:80 H:48 H:61 H:103 H:114	SER PRO VAL ALA GLY THR	LYS SER LEU GLY VAL SER	**-27.44**	**-5.02**	6
41	L:9 L:32 L:43 L:51 H:92 H:103	SER ALA ALA ALA ALA GLY	LYS VAL PRO SER GLY VAL	**-27.44**	**-11.48**	6
42	L:9 L:102 H:58 H:92 H:103	SER THR THR ALA GLY	ARG ASN ILE GLY VAL	**-27.43**	**-7.56**	5
43	L:9 L:32 L:43 L:51 H:92 H:103	SER ALA ALA ALA ALA GLY	LYS VAL PRO SER VAL VAL	**-27.42**	**-6.93**	6
44	L:9 L:40 L:102 H:58 H:92 H:103	SER PRO THR THR ALA GLY	ARG SER ILE ILE GLY VAL	**-27.42**	**-2.22**	6
45	L:9 L:80 H:48 H:61 H:103	SER PRO VAL ALA GLY	LYS SER LEU GLY VAL	**-27.4**	**-14.41**	5
46	L:9 L:31 H:48 H:92 H:103	SER THR VAL ALA GLY	ARG SER ILE GLY VAL	**-27.39**	**-30.88**	5
47	L:9 L:80 H:48 H:92 H:103	SER PRO VAL ALA GLY	LYS ALA ILE VAL VAL	**-27.36**	**-17.32**	5
48	L:9 L:31 H:48 H:61 H:92 H:103	SER THR VAL ALA ALA GLY	ARG SER ILE VAL GLY VAL	**-27.36**	**-33**	6

Figura 12 (Continuação)

49	L:9 L:76 L:80 H:48 H:103	SER SER PRO VAL GLY	LYS THR SER LEU VAL	**-27.35**	**-23.57**	5
50	L:9 L:43 L:102 H:58 H:92 H:103	SER ALA THR THR ALA GLY	ARG PHE ASN ILE GLY VAL	**-27.35**	**-12.66**	6
51	L:9 L:76 L:80 L:85 H:48 H:103	SER SER PRO THR VAL GLY	LYS THR SER ASN LEU VAL	**-27.33**	**-21.75**	6
52	L:9 L:31 H:48 H:58 H:92 H:103	SER THR VAL THR ALA GLY	LYS SER ILE ASN GLY VAL	**-27.33**	**-18.94**	6
53	L:9 L:34 L:40 L:43 H:48 H:103	SER ALA PRO ALA VAL GLY	LYS VAL SER PRO ILE VAL	**-27.33**	**-8.88**	6
54	L:9 L:34 L:40 L:43 H:48 H:103	SER ALA PRO ALA VAL GLY	LYS VAL ALA PRO ILE VAL	**-27.33**	**-8.83**	6
55	L:9 L:31 H:48 H:58 H:92 H:103	SER THR VAL THR ALA GLY	LYS SER ILE ASN VAL VAL	**-27.33**	**-14.67**	6
56	L:9 L:80 H:48 H:92 H:103	SER PRO VAL ALA GLY	ARG ALA ILE VAL VAL	**-27.31**	**-28.91**	5
57	L:9 L:31 H:48 H:58 H:92 H:103	SER THR VAL THR ALA GLY	ARG SER ILE ASN GLY VAL	**-27.28**	**-30.63**	6
58	L:9 L:51 L:102 H:92 H:103	SER ALA THR ALA GLY	ILE THR SER GLY VAL	**-27.26**	**-10.74**	5
59	L:9 L:25 L:34 L:101 H:92 H:103	SER ALA ALA GLY ALA GLY	ILE GLY VAL ALA GLY VAL	**-27.26**	**-5.16**	6

Figura 12 (Continuação)

60	L:9 L:51 L:102 H:92 H:103	SER ALA THR ALA GLY	ILE THR SER VAL VAL	**-27.25**	**-6.31**	5
61	L:9 L:51 L:102 H:16 H:92 H:103	SER ALA THR GLY ALA GLY	ILE THR SER ALA VAL VAL	**-27.24**	**-8.9**	6
62	L:9 L:40 L:102 H:26 H:92 H:103	SER PRO THR GLY ALA GLY	ARG SER ILE ASP GLY VAL	**-27.23**	**-3.17**	6
63	L:9 L:43 L:47 L:51 H:58 H:103	SER ALA LEU ALA THR GLY	THR ASN VAL THR SER VAL	**-27.17**	**-14.19**	6
64	L:9 L:43 H:114	SER ALA THR	LYS PHE SER	**-27.14**	**-21.57**	3
65	L:9 L:43 L:46 H:61 H:103 H:114	SER ALA LEU ALA GLY THR	ARG ASN ILE VAL VAL ASN	**-27.14**	**-20.43**	6
66	L:9 L:46 H:61 H:79 H:103 H:114	SER LEU ALA ALA GLY THR	ARG ILE VAL GLY VAL ASN	**-27.13**	**-4.64**	6
67	L:9 L:43 L:46 L:80 H:61 H:103	SER ALA LEU PRO ALA GLY	LYS ASN ILE SER VAL VAL	**-27.11**	**-8.25**	6
68	L:9 L:34 L:80 H:48 H:92 H:103	SER ALA PRO VAL ALA GLY	ARG VAL ALA ILE VAL VAL	**-27.09**	**-19.97**	6
69	L:9 L:47 L:51 H:58 H:103	SER LEU ALA THR GLY	THR VAL THR SER VAL	**-27.07**	**-6.22**	5
70	L:9 L:43 L:46 H:61 H:103	SER ALA LEU ALA GLY	ARG ASN ILE VAL VAL	**-27.06**	**-18.58**	5

Figura 12 (Continuação)

71	L:9 L:43 L:46 L:80 H:61 H:103	SER ALA LEU PRO ALA GLY	ARG ASN ILE SER VAL VAL	**-27.06**	**-19.84**	6
72	L:9 L:47 L:51 H:48 H:58 H:103	SER LEU ALA VAL THR GLY	THR VAL THR ILE SER VAL	**-27.05**	**-13.69**	6
73	L:9 L:46 H:61 H:103 H:114	SER LEU ALA GLY THR	ARG ILE VAL VAL ASN	**-27.04**	**-12.6**	5
74	L:9 L:46 H:61 H:103 H:114	SER LEU ALA GLY THR	ARG ILE GLY VAL ASN	**-27.03**	**-5.96**	5
75	L:9 L:43 L:80 H:61 H:103	SER ALA PRO ALA GLY	LYS ASN SER VAL VAL	**-27.03**	**-21.94**	5
76	L:9 L:80 H:48 H:92 H:103 H:114	SER PRO VAL ALA GLY THR	ARG SER PHE VAL VAL ASN	**-27.03**	**-3.91**	6
77	L:9 L:43 L:47 H:79 H:103 H:114	SER ALA LEU ALA GLY THR	THR ASN VAL GLY VAL SER	**-27.02**	**-2.42**	6
78	L:9 L:25 L:80 H:92 H:103	SER ALA PRO ALA GLY	ARG GLY SER VAL VAL	**-27.01**	**-15.68**	5
79	L:9 L:25 L:80 H:92 H:103	SER ALA PRO ALA GLY	ARG GLY ALA VAL VAL	**-27.01**	**-11.32**	5
80	L:9 L:80 H:48 H:88 H:92 H:103	SER PRO VAL ALA ALA GLY	ARG ALA ILE ASP VAL VAL	**-27.01**	**-29.42**	6
81	L:9 L:43 L:47 H:79 H:103	SER ALA LEU ALA GLY	THR ASN VAL GLY VAL	**-26.99**	**-11.87**	5

Figura 12 (Continuação)

82	L:9 L:46 L:101 H:61 H:103 H:114	SER LEU GLY ALA GLY THR	ARG ILE VAL GLY VAL ASN	**-26.98**	**-6.88**	6
83	L:9 L:25 L:80 L:93 H:92 H:103	SER ALA PRO THR ALA GLY	ARG GLY ALA SER VAL VAL	**-26.98**	**-9.2**	6
84	L:9 L:80 H:48 H:92 H:103	SER PRO VAL ALA GLY	ARG SER PHE VAL VAL	**-26.97**	**-9.61**	5
85	L:9 L:43 L:80 H:61 H:103	SER ALA PRO ALA GLY	LYS GLY SER VAL VAL	**-26.97**	**-9.64**	5
86	L:9 L:43 L:47 H:58 H:103 H:114	SER ALA LEU THR GLY THR	THR ASN VAL SER VAL SER	**-26.97**	**-4.88**	6
87	L:9 L:43 L:47 H:48 H:79 H:103	SER ALA LEU VAL ALA GLY	THR ASN VAL ILE GLY VAL	**-26.97**	**-19.34**	6
88	L:9 L:51 L:76 L:80 L:101 H:103	SER ALA SER PRO GLY GLY	LYS SER THR SER ASP VAL	**-26.96**	**-19.77**	6
89	L:9 L:43 L:47 H:103 H:114	SER ALA LEU GLY THR	THR ASN VAL VAL SER	**-26.94**	**-10.37**	5
90	L:9 L:43 H:114	SER ALA THR	THR PHE SER	**-26.36**	**-37.27**	3
91	L:9 L:43 L:51 L:85 H:79 H:103	SER ALA ALA THR ALA GLY	ARG ASN SER ILE GLY ALA	**-26.29**	**-2.22**	6
92	L:9 L:93 H:92 H:103 H:114	SER THR ALA GLY THR	ARG ILE GLY VAL ILE	**-25.78**	**-12.61**	5
93	L:9 L:43 H:106	SER ALA ALA	LYS PHE GLY	**-25.73**	**-25.84**	3

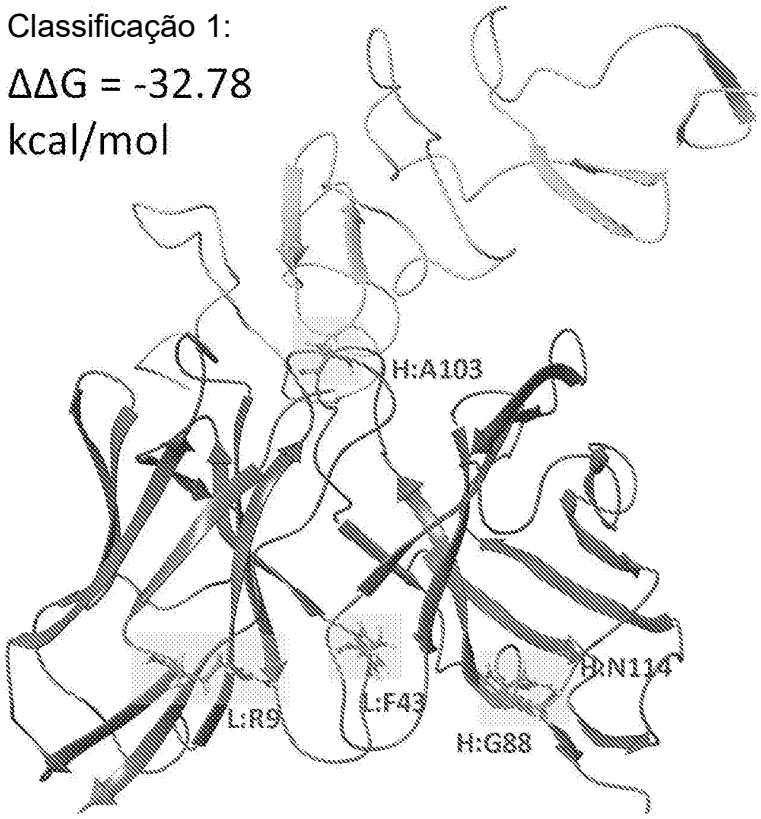
94	L:9 L:93 H:16 H:103	SER THR GLY GLY	LYS ILE VAL ALA	**-25.31**	**-52.18**	4
95	L:9 L:43 L:101 H:92 H:103	SER ALA GLY ALA GLY	ARG PHE VAL VAL VAL	**-25.24**	**-4.24**	5
96	L:9 L:93 H:92 H:103 H:114	SER THR ALA GLY THR	ARG ILE GLY VAL SER	**-25.23**	**-13.15**	5
97	L:9 H:85 H:92 H:103 H:114	SER SER ALA GLY THR	ARG ARG VAL VAL ASN	**-25.15**	**-23.8**	5
98	L:9 L:80 H:92 H:103 H:114	SER PRO ALA GLY THR	ARG THR GLY VAL ILE	**-25.09**	**-22.29**	5
99	L:9 L:101 H:92 H:103 H:114	SER GLY ALA GLY THR	LYS ALA GLY VAL ASN	**-25.07**	**-10.03**	5
100	L:9 H:56 H:79 H:103 H:114	SER GLY ALA GLY THR	ARG ALA VAL VAL ASN	**-25.03**	**-40.37**	5

Figura 12 (Continuação)

Figura 13A

Classificação 1:

ΔΔG = -32.78 kcal/mol



Classificação 2:

ΔΔG = -32.48 kcal/mol

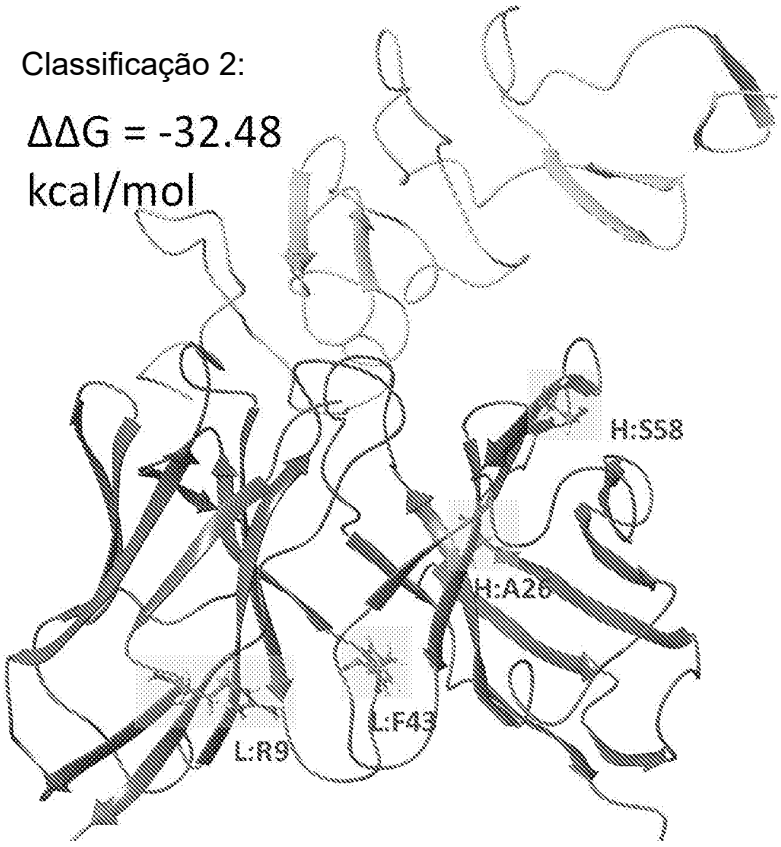
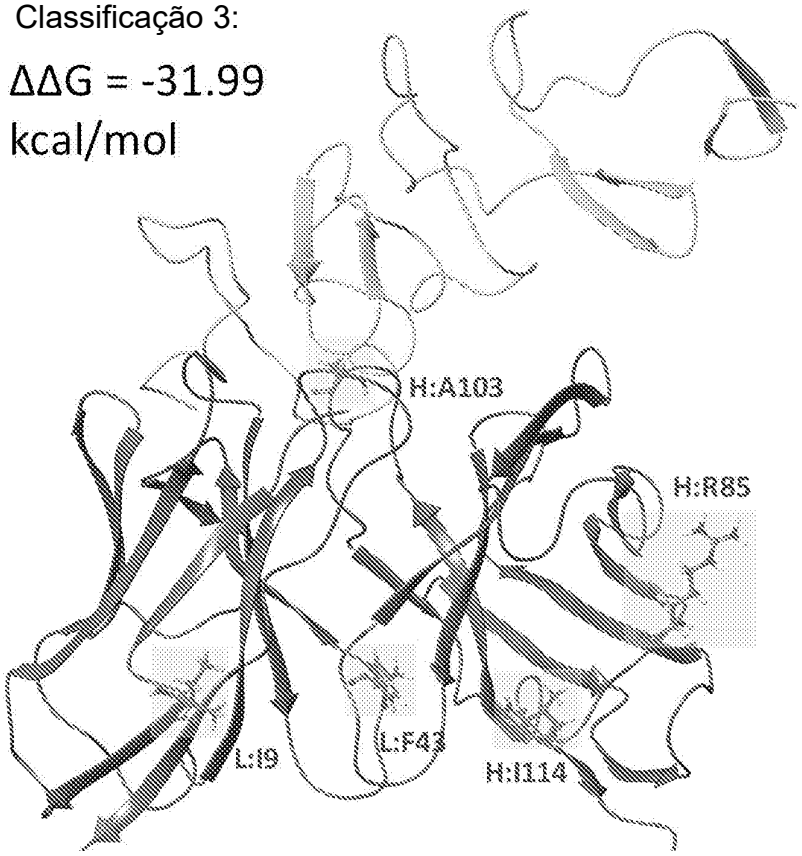


Figura 13B

Classificação 3:

ΔΔG = -31.99 kcal/mol



Classificação 4:

ΔΔG = -31.91 kcal/mol

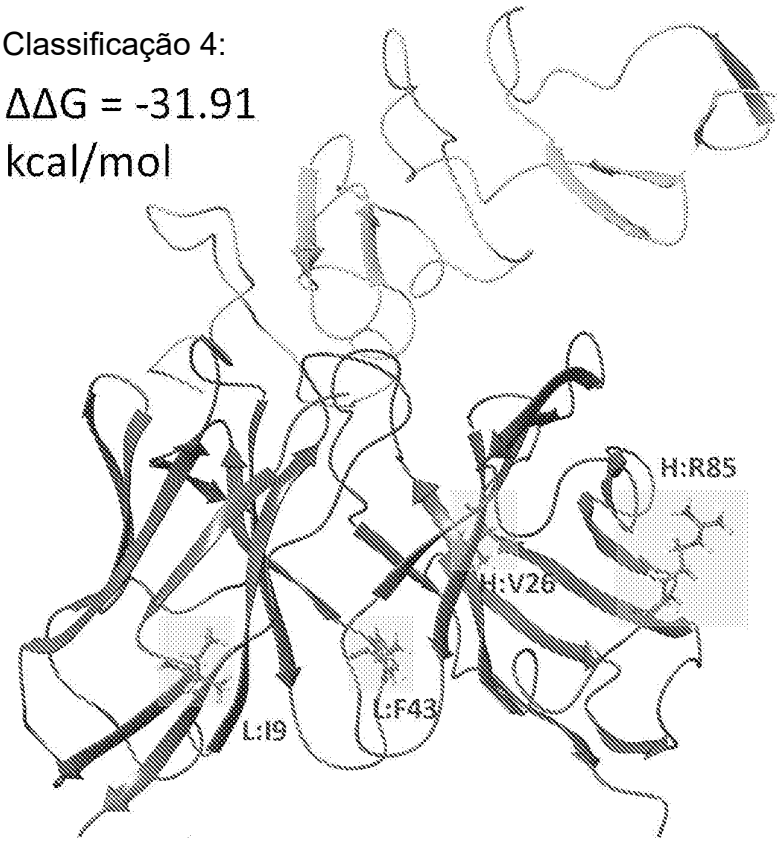


Figura 13C

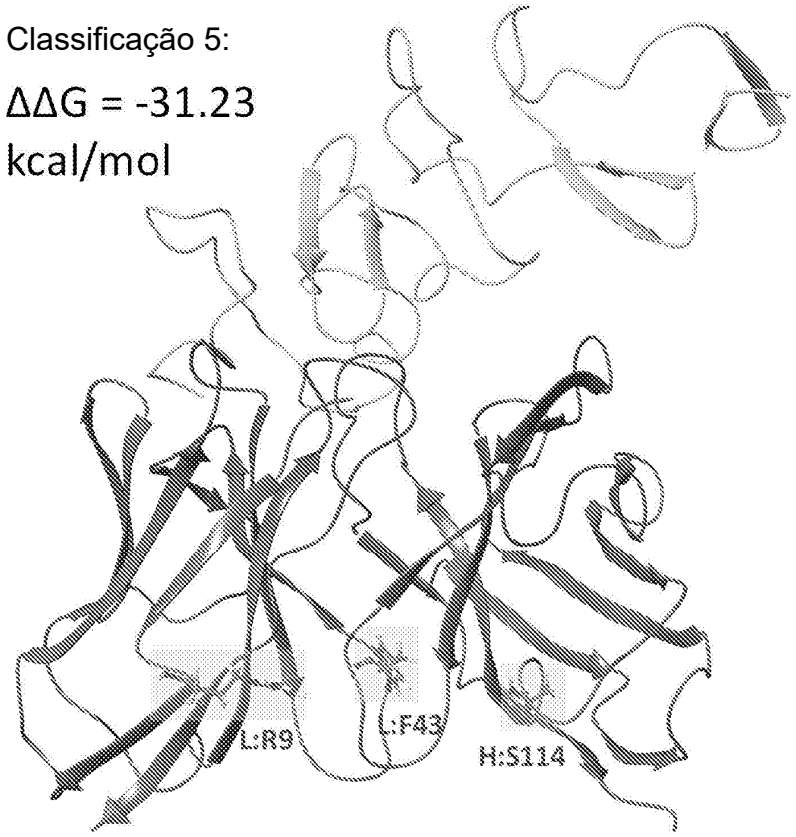


Figura 14

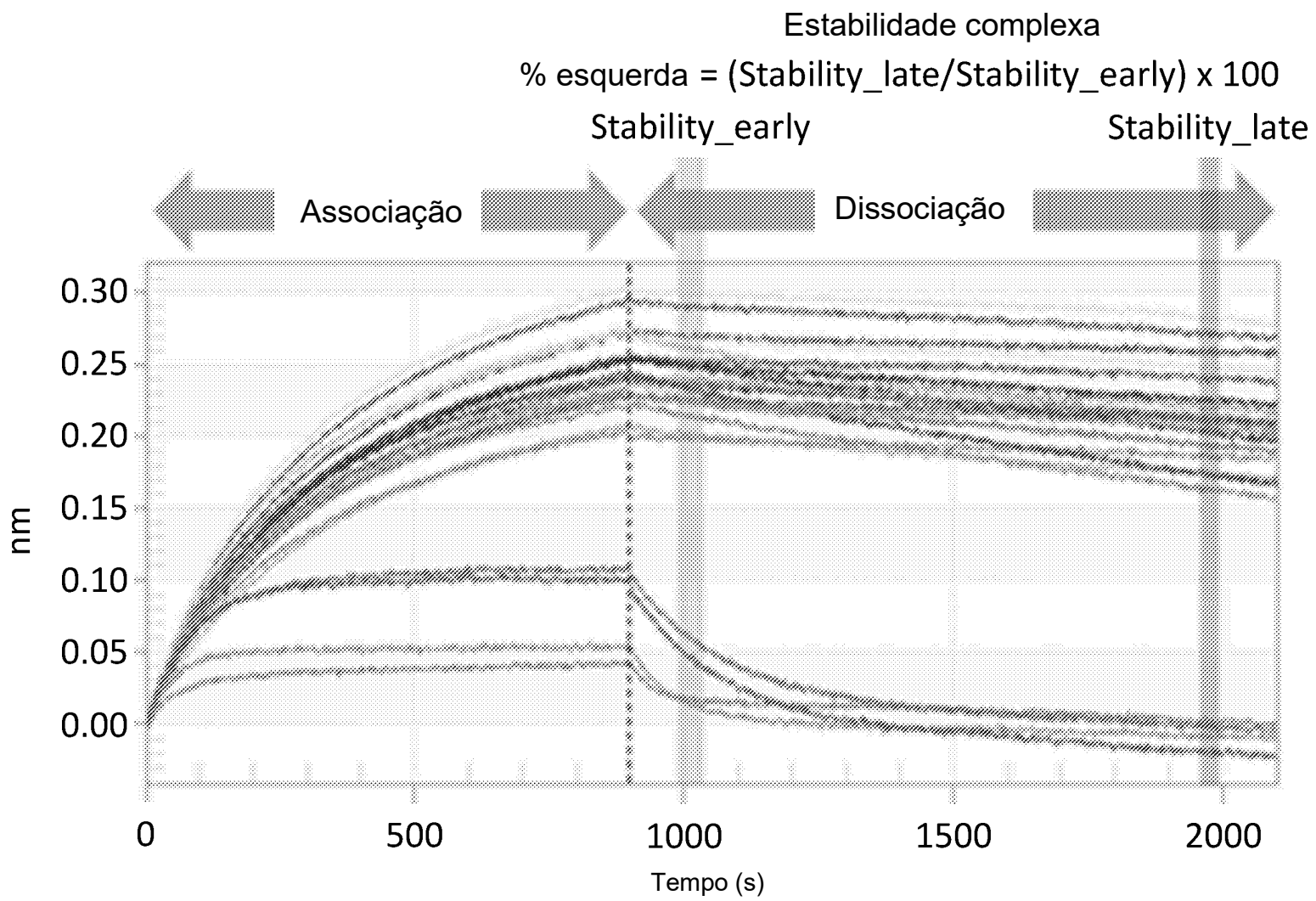

Estabilidade complexa
% esquerda = (Stability_late/Stability_early) x 100
Stability_early
Stability_late
Associação
Dissociação
0.30
0.25
0.20
0.15
0.10
0.05
0.00
nm
0
500
1000
1500
2000
Tempo (s)

Figura 15

Classificação de dissociação de variantes de Trastuzumabe que se ligam a HER2

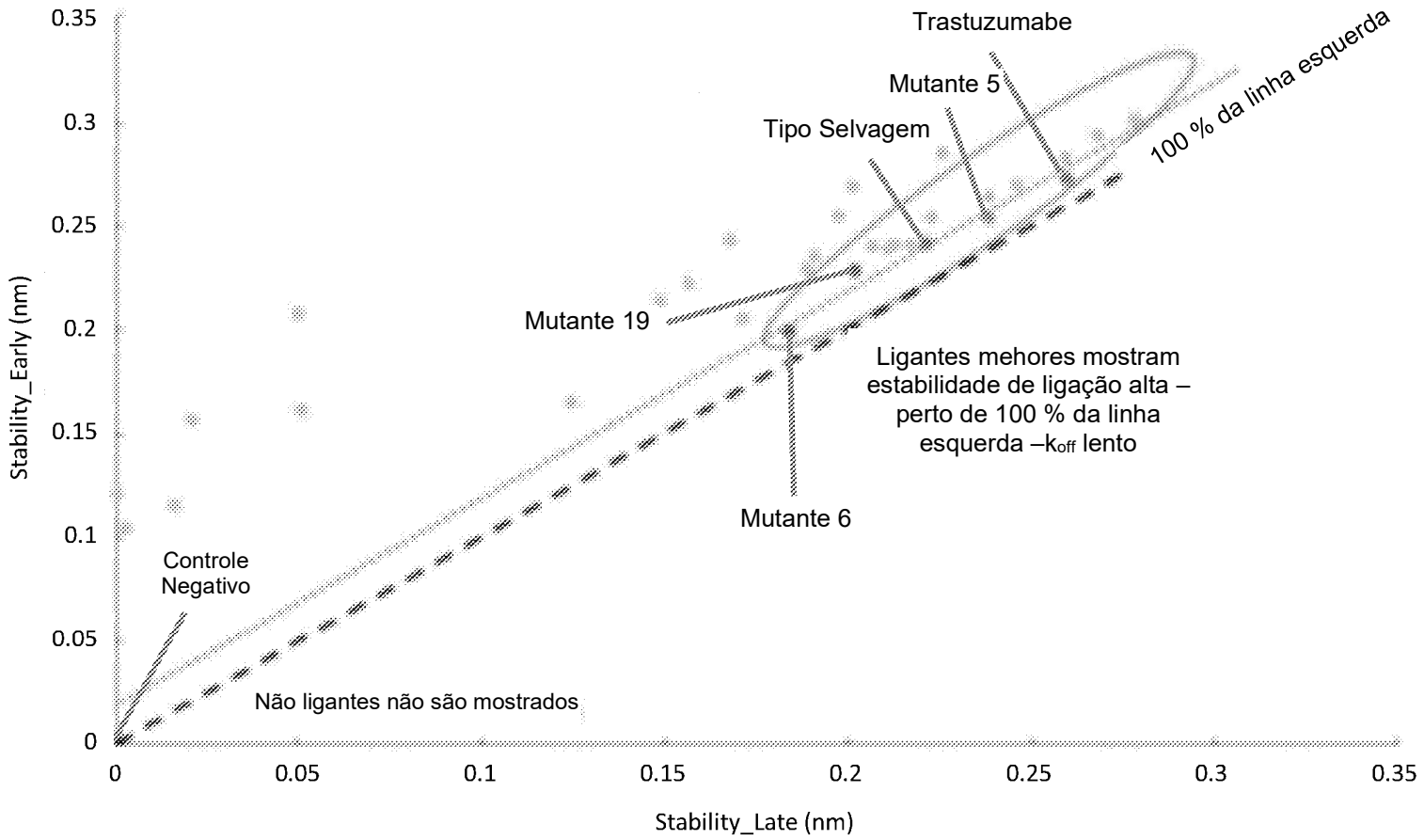
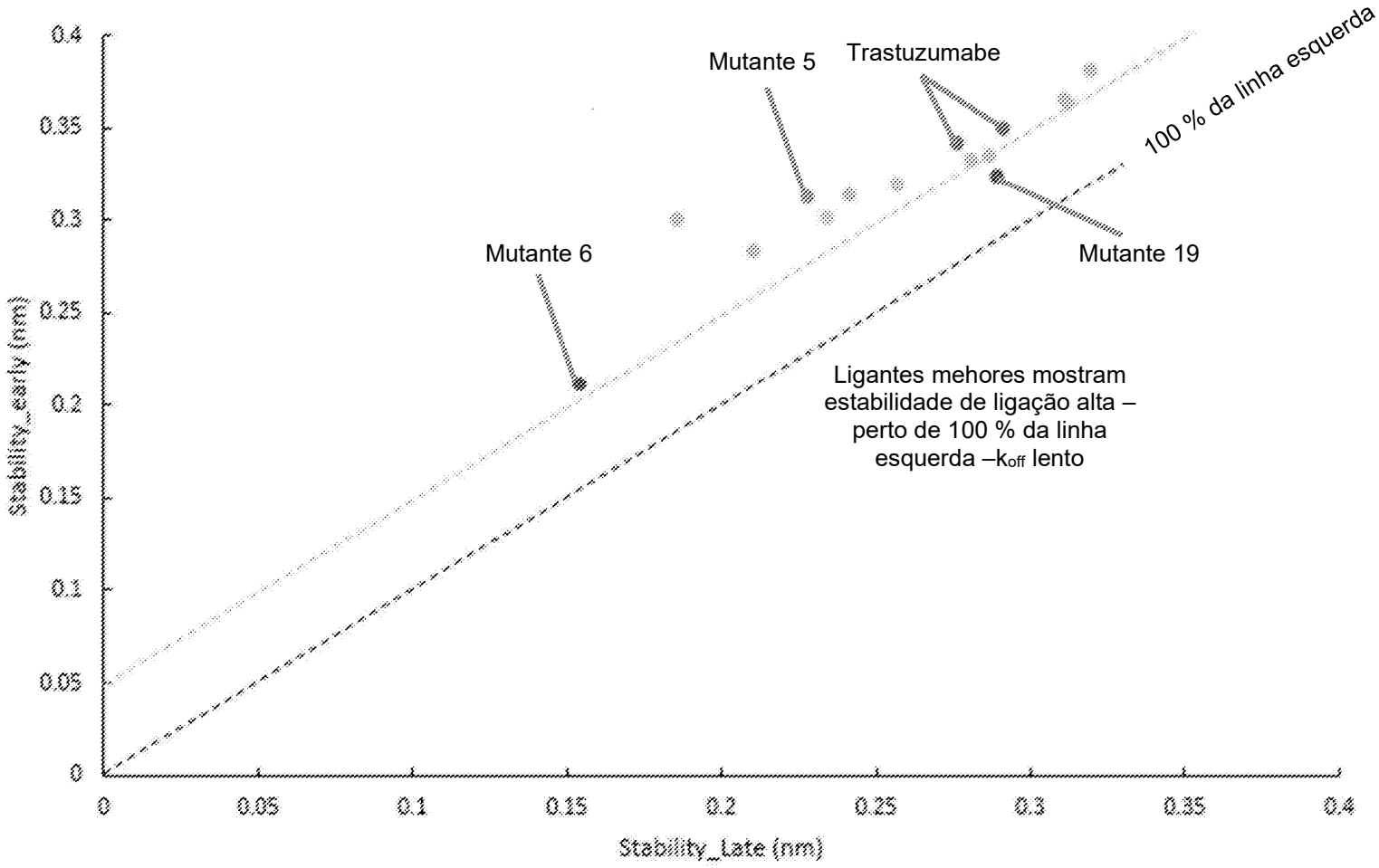


Figura 16

Classificação de dissociação de variantes de Trastuzumabe que se ligam a HER2



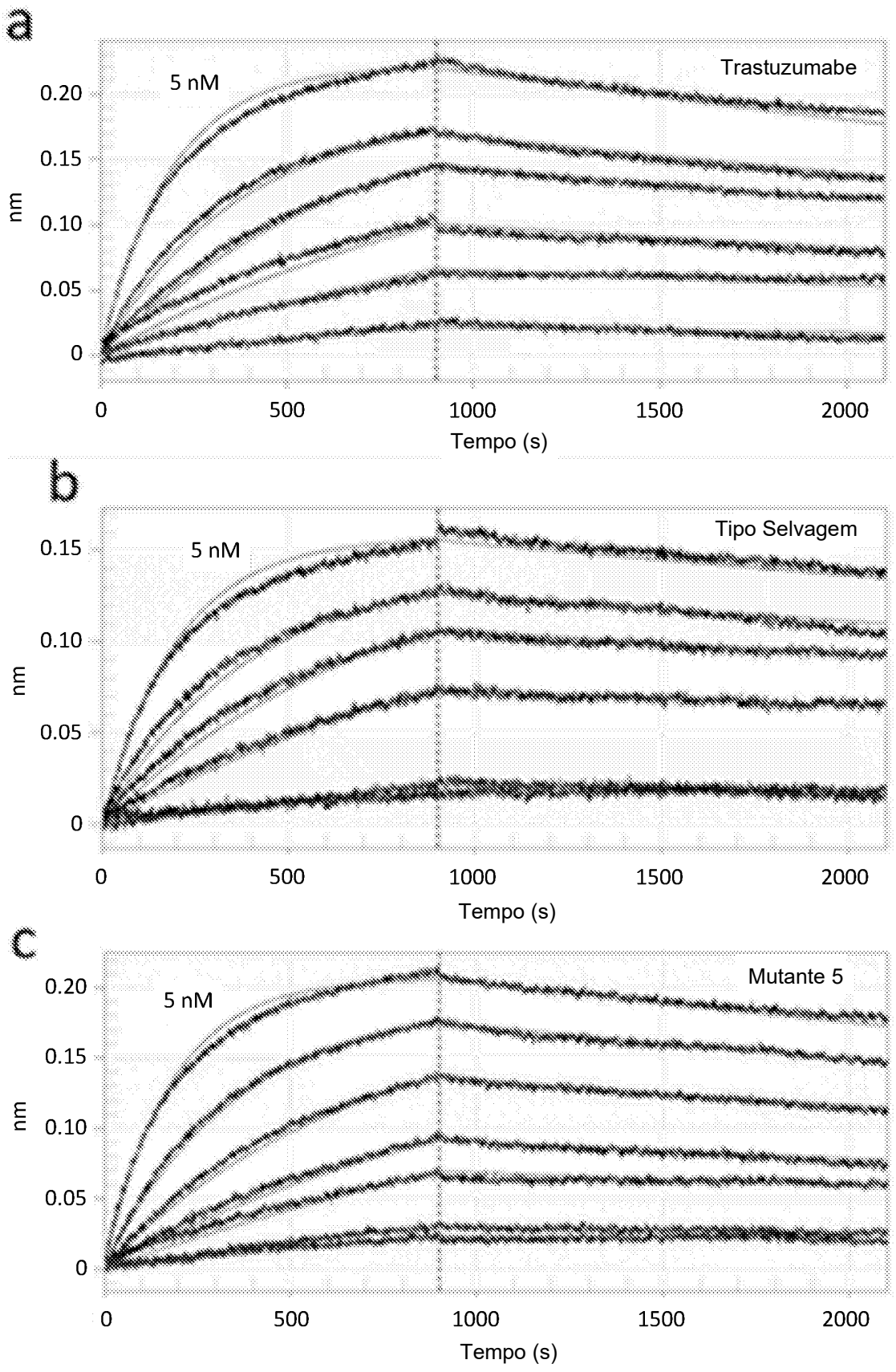

a
5 nM
Trastuzumabe
0.20
0.15
0.10
0.05
0
nm
0
500
1000
1500
2000
Tempo (s)
b
5 nM
Tipo Selvagem
0.15
0.10
0.05
0
nm
0
500
1000
1500
2000
Tempo (s)
c
5 nM
Mutante 5
0.20
0.15
0.10
0.05
0
nm
0
500
1000
1500
2000
Tempo (s)

Figura 17

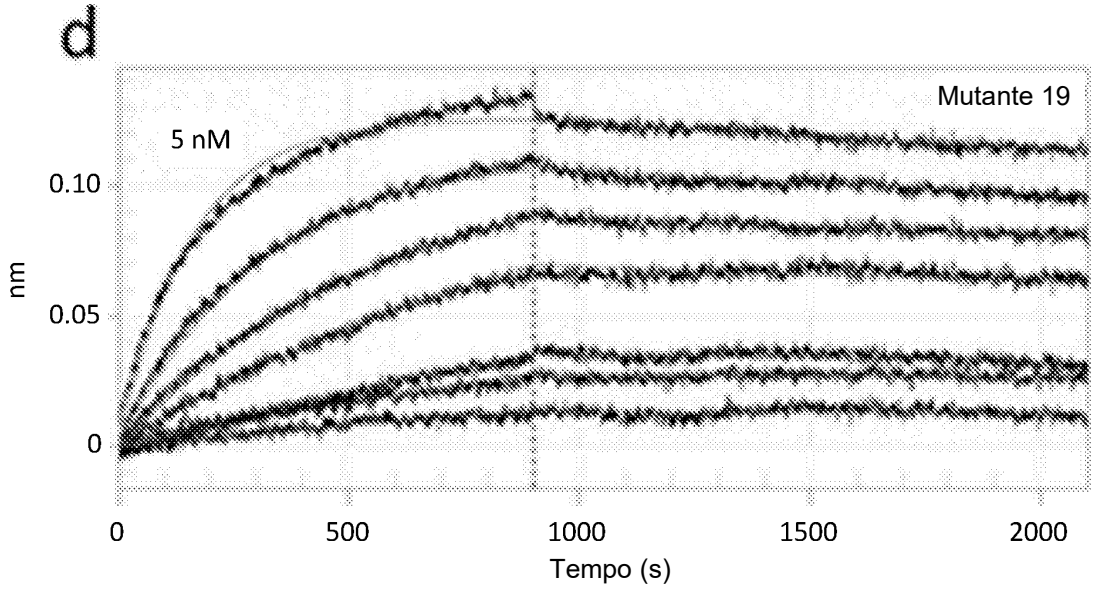


Figura 17 (Continuação)

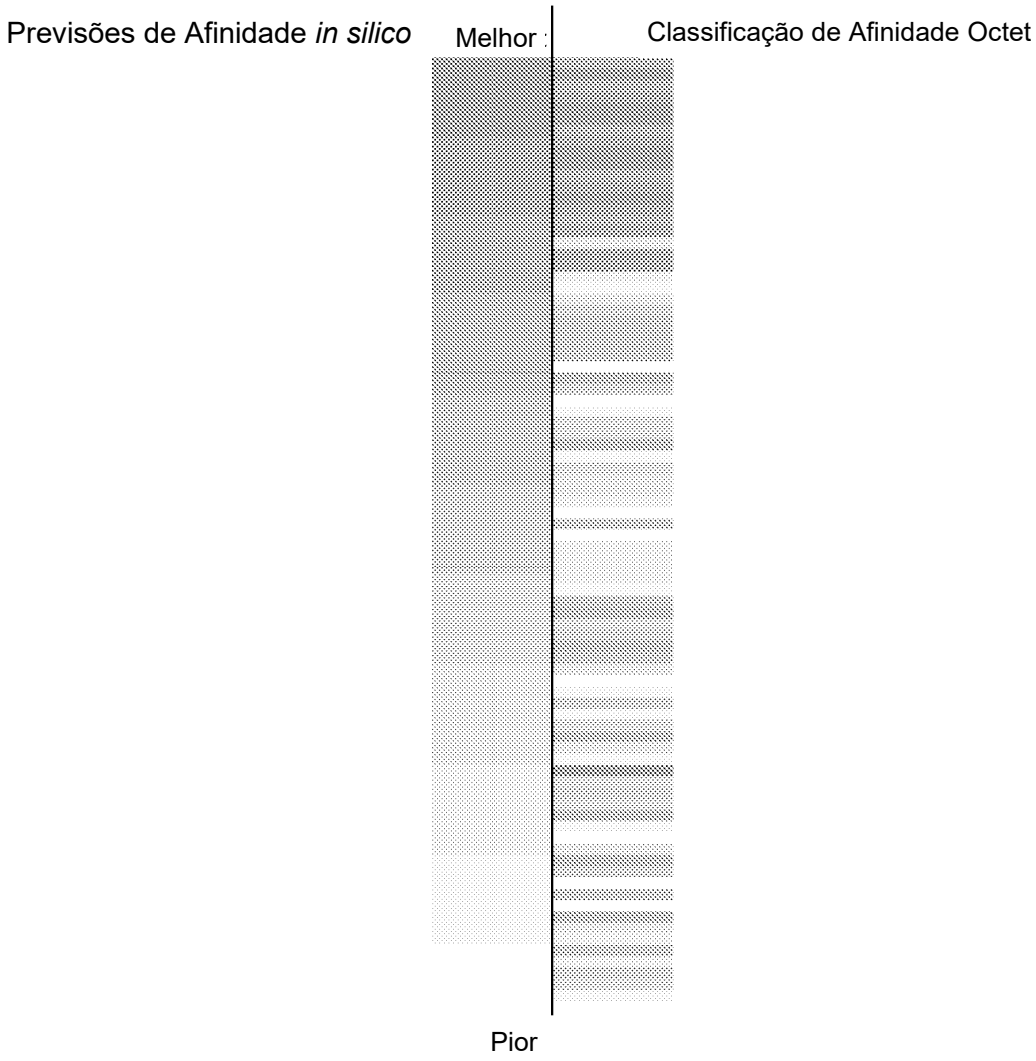

Previsões de Afinidade *in silico*
Melhor
Classificação de Afinidade Octet
Pior

Figura 18

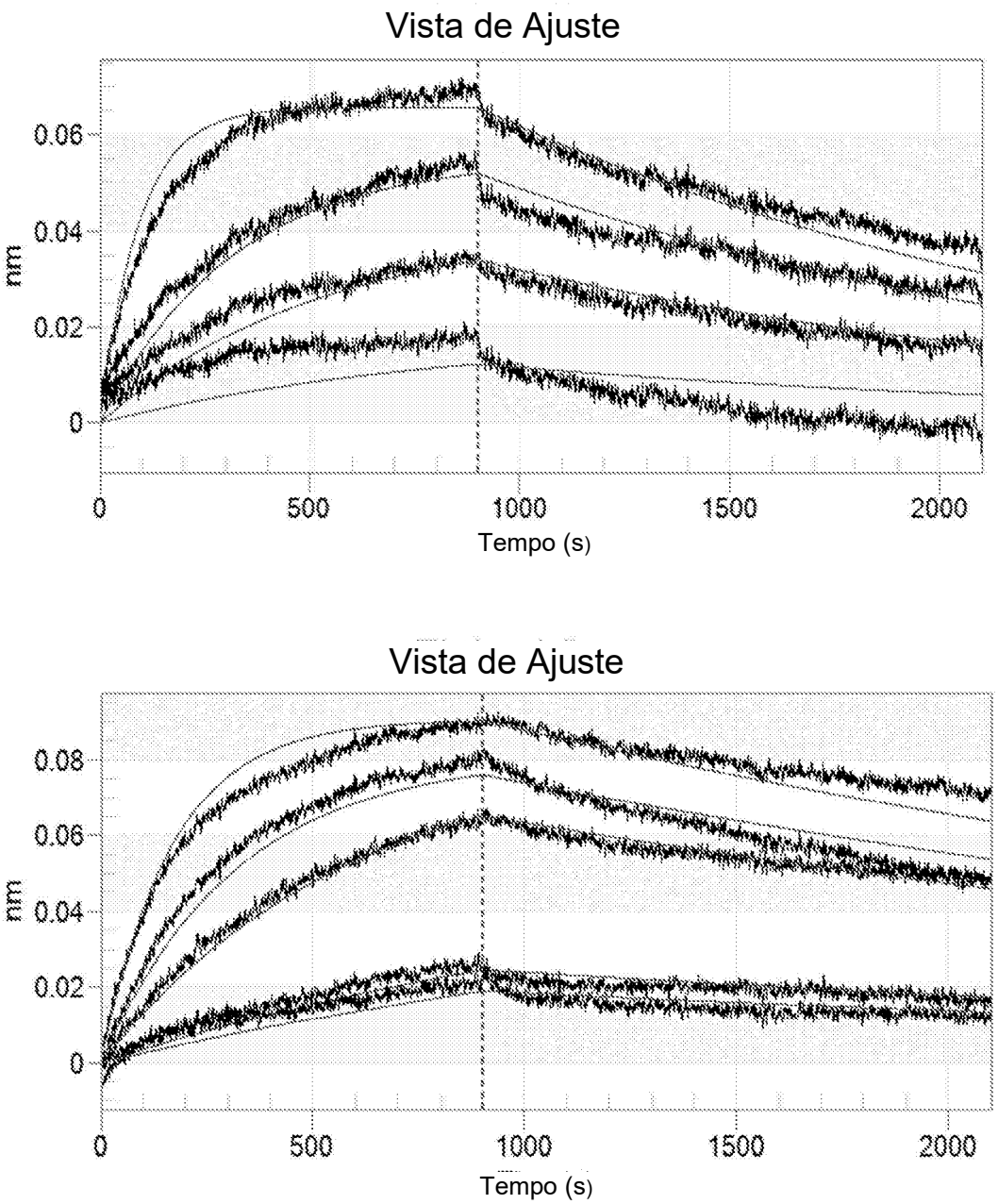

Vista de Ajuste
nm
0.06
0.04
0.02
0
0
500
1000
1500
2000
Tempo (s)
Vista de Ajuste
nm
0.08
0.06
0.04
0.02
0
0
500
1000
1500
2000
Tempo (s)

Figura 19

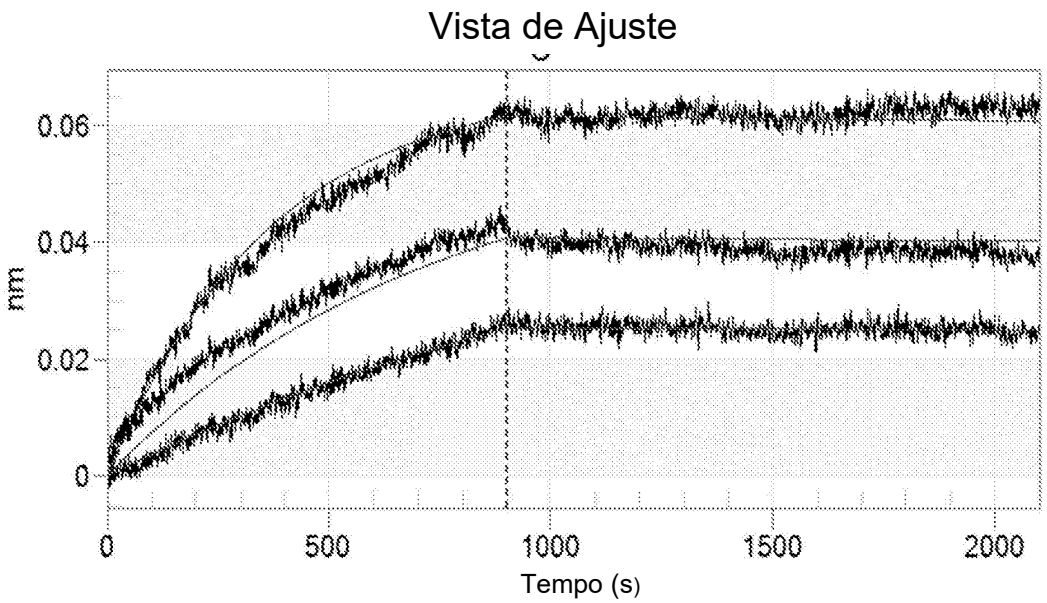
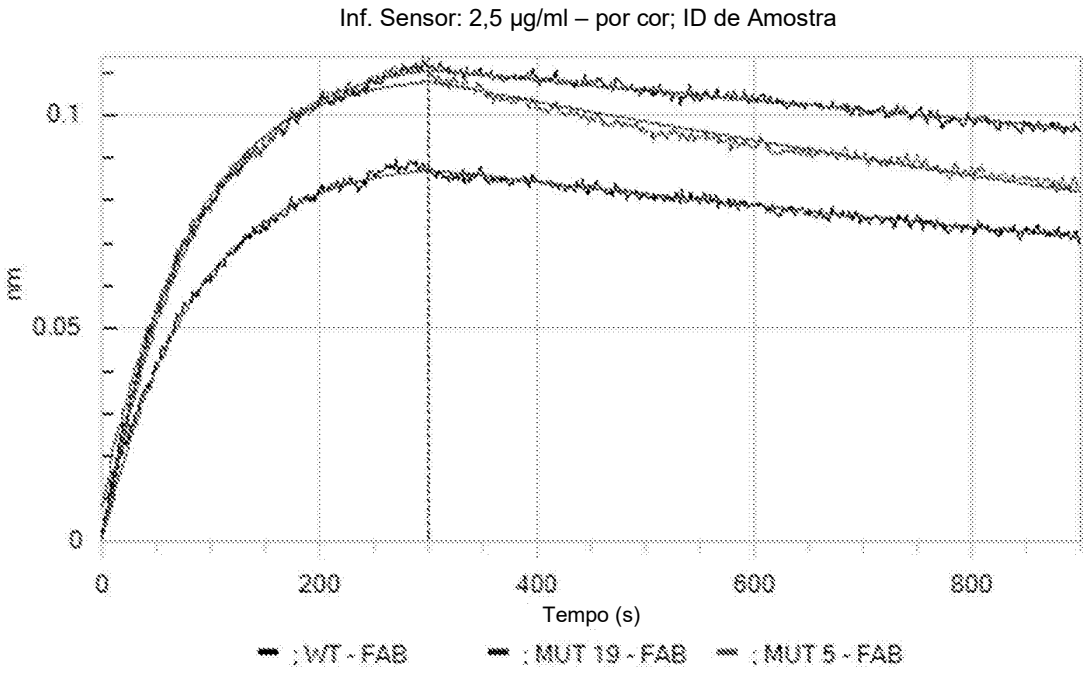


Figura 19 (Continuação)


Inf. Sensor: 2,5 µg/ml – por cor; ID de Amostra
nm
0.1
0.05
0
0
200
400
600
800
Tempo (s)
; WT - FAB
; MUT 19 - FAB
; MUT 5 - FAB

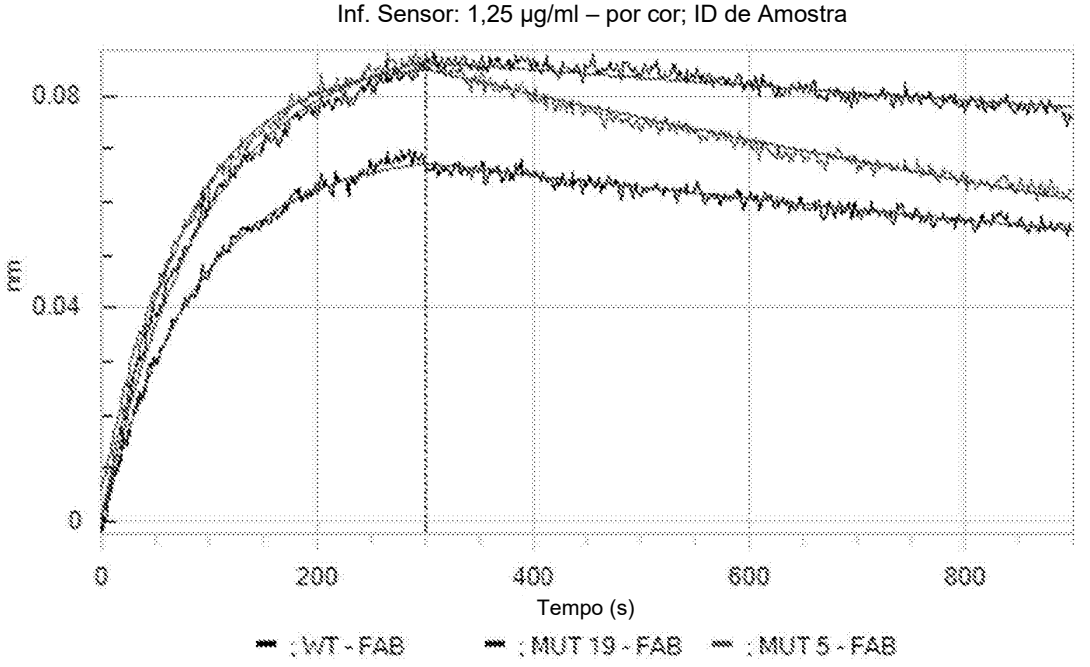

Inf. Sensor: 1,25 µg/ml – por cor; ID de Amostra
nm
0.08
0.04
0
0
200
400
600
800
Tempo (s)
; WT - FAB
; MUT 19 - FAB
; MUT 5 - FAB

Figura 20

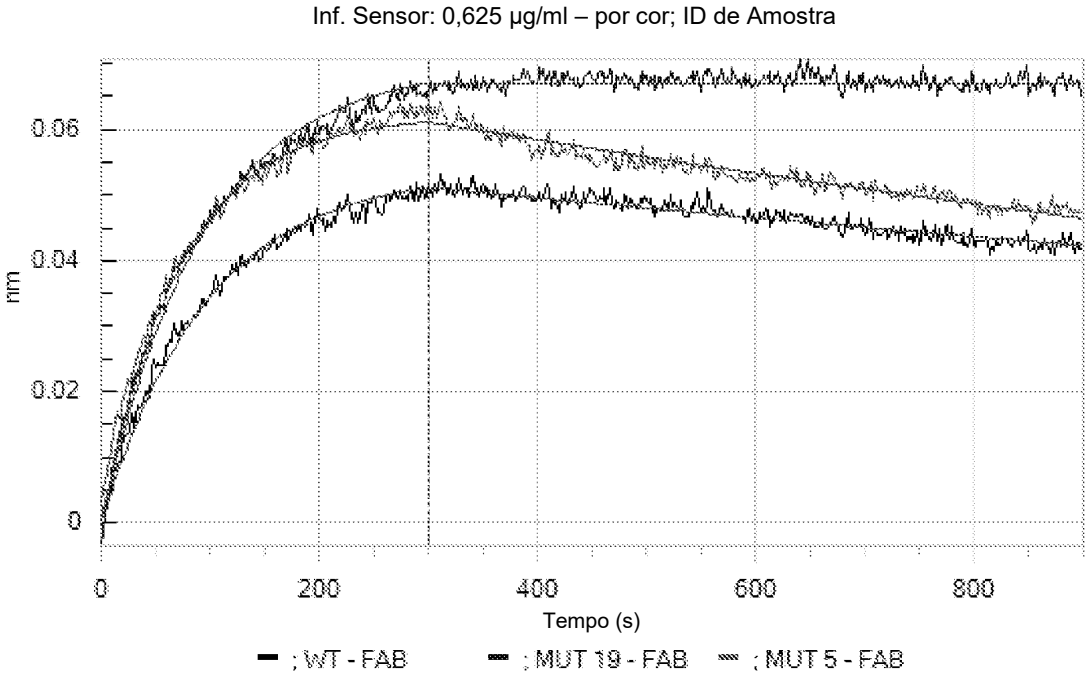


Figura 20 (Continuação)

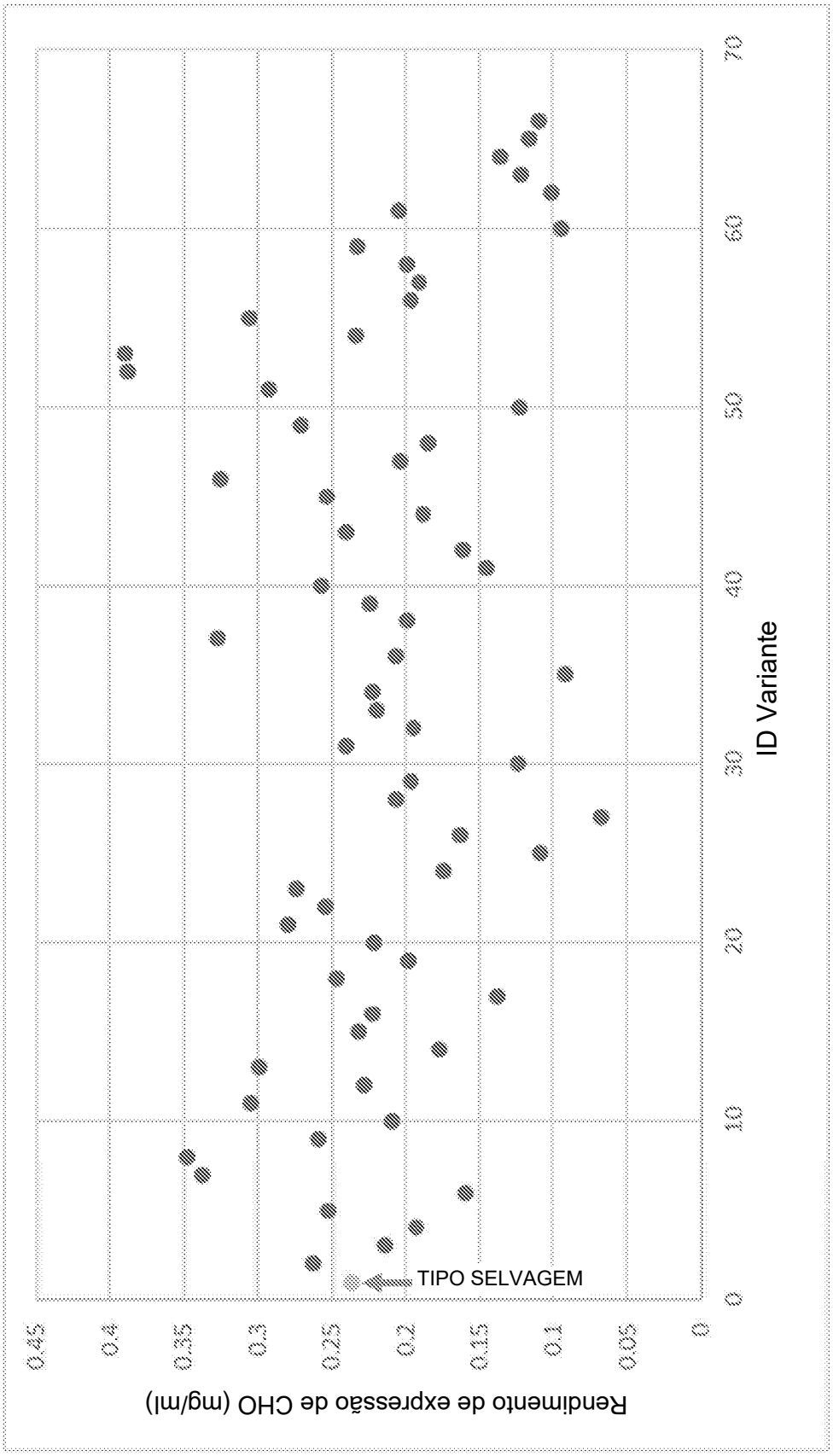

Rendimento de expressão de CHO (mg/ml)
0.45
0.4
0.35
0.3
0.25
0.2
0.15
0.1
0.05
0
0
10
20
30
40
50
60
70
ID Variante
TIPO SELVAGEM

Figura 21

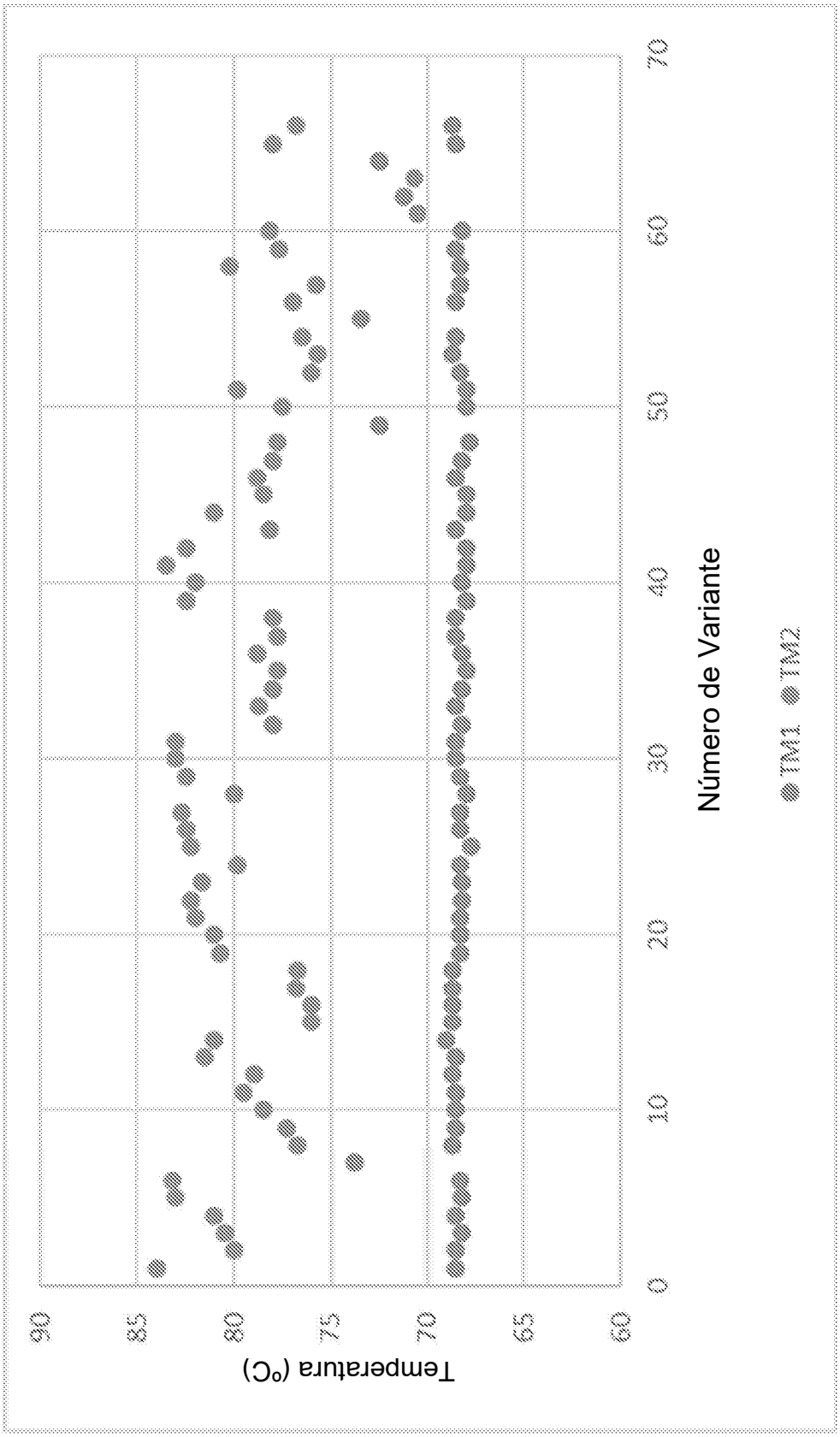

Temperatura (°C)
90
85
80
75
70
65
60
0
10
20
30
40
50
60
70
Número de Variante
TM1
TM2

Figura 22

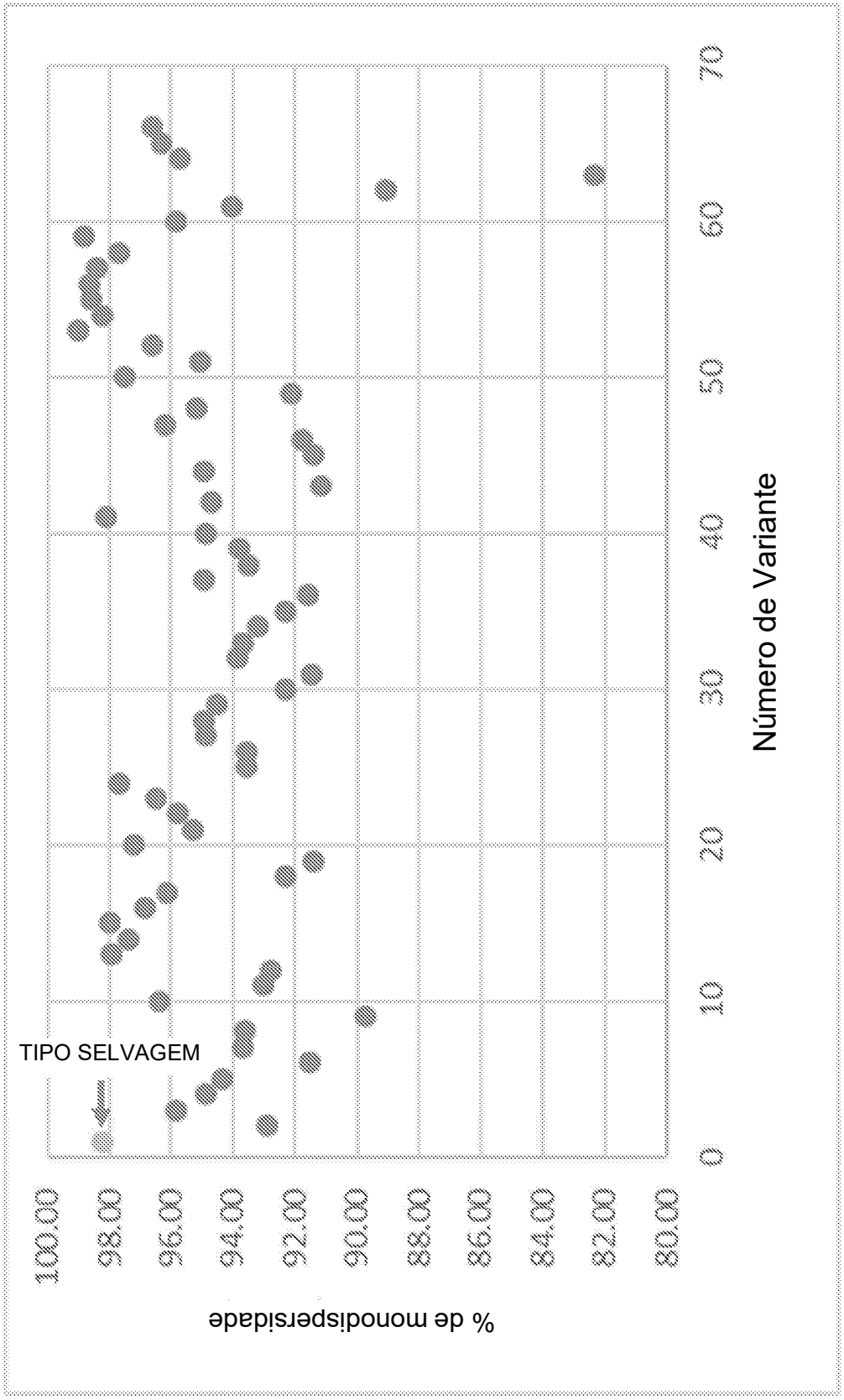

TIPO SELVAGEM
% de monodispersidade
100,00
98,00
96,00
94,00
92,00
90,00
88,00
86,00
84,00
82,00
80,00
0
10
20
30
40
50
60
70
Número de Variante

Figura 23

RESUMO

“MÉTODO E BIBLIOTECA DE ANTICORPO”

Esta divulgação se refere a métodos de geração de bibliotecas de anticorpo, bibliotecas de anticorpo produzidas usando tais métodos, e anticorpos variantes. Atualmente, os métodos de melhorar ligação de anticorpo (ensaios de maturação de afinidade) requerem a triagem de vastas bibliotecas de variantes de anticorpo (geralmente $>10^{10}$) para identificar uma pequena fração de variantes com características melhoradas. A presente invenção envolve tomar a sequência de nucleotídeo da região determinante de estrutura e complementaridade de um anticorpo alvo e identificar motivos que seriam reconhecidos por desaminação de enzimas de hipermutação somática. Uma pequena biblioteca de variantes é, então, criada incorporando uma ou mais dessas mutações. Verificou-se que uma razão relativamente alta das variantes têm uma afinidade aumentada. A técnica da presente invenção foi demonstrada nos anticorpos trastuzumabe e Catepsina S, e as variantes produzidas também são reivindicadas.

Este anexo apresenta o código de controle da listagem de sequências biológicas.

Código de Controle

Campo 1



Campo 2



Outras Informações:

- Nome do Arquivo: listagem_sequência.txt
- Data de Geração do Código: 20/04/2021
- Hora de Geração do Código: 15:53:57
- Código de Controle:
  - Campo 1: 92778061AEB8CE7D
  - Campo 2: 2F8AE7CC679AF3DA