



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

(21) BR 112019013955-9 A2



(22) Data do Depósito: 05/01/2018

(43) Data da Publicação Nacional: 11/02/2020

(54) Título: COMPOSIÇÕES E MÉTODOS RELACIONADOS A CONSTRUTOS DE FC MANIPULADOS

(51) Int. Cl.: A61K 39/00; A61K 39/395; C07K 16/00; C07K 16/46.

(30) Prioridade Unionista: 06/01/2017 US 62/443,495; 21/11/2017 US 62/589,473; 23/05/2017 US 62/510,228.

(71) Depositante(es): MOMENTA PHARMACEUTICALS, INC..

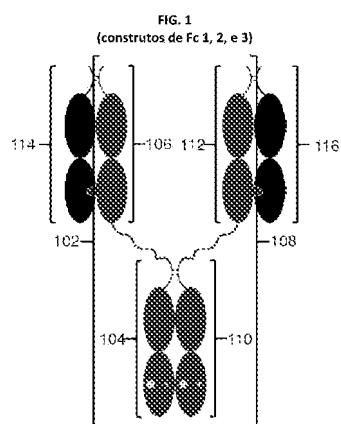
(72) Inventor(es): CARLOS J. BOSQUES; JONATHAN C. LANSING; DANIEL ORTIZ.

(86) Pedido PCT: PCT US2018012488 de 05/01/2018

(87) Publicação PCT: WO 2018/129255 de 12/07/2018

(85) Data da Fase Nacional: 05/07/2019

(57) Resumo: A presente divulgação refere-se a construtos de Fc de IgG manipulados e a seus usos.



Relatório Descritivo da Patente de Invenção para "COMPOSIÇÕES E MÉTODOS RELACIONADOS A CONSTRUTOS DE FC MANIPULADOS".

REFERÊNCIA CRUZADA A PEDIDOS RELACIONADOS

[001] Este pedido reivindica o benefício das datas de depósito do Pedido Provisório U.S. nº 62/443,495, depositado em 6 de janeiro de 2017, Pedido Provisório U.S. nº 62/510,228, depositado em 23 de maio de 2017 e Pedido Provisório U.S. nº 62/589,473, depositado em 21 de novembro de 2017. Os conteúdos de cada um desses pedidos são incorporados neste documento por referência em sua totalidade.

ANTECEDENTES

[002] Proteínas terapêuticas, por exemplo, anticorpos terapêuticos e proteínas de fusão Fc, rapidamente tornaram-se uma classe de fármacos clinicamente importantes para pacientes com doenças imunológicas e inflamatórias, cânceres e infecções.

SUMÁRIO

[003] A presente descrição apresenta construtos terapêuticos contendo um domínio Fc biologicamente ativo. Tais construtos podem ter meia-vida sérica e/ou afinidade de ligação e/ou avidez por receptores Fc desejáveis.

[004] Em geral, a descrição apresenta construtos de Fc tendo 2-10 domínios Fc, por exemplo, construtos de Fc tendo 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, ou 10 domínios Fc. Em algumas modalidades, o construto de Fc inclui 2-10 domínios Fc, 2-5 domínios Fc, 2-4 domínios Fc, 2-3 domínios Fc, 3-5 domínios Fc, 2-8 domínios Fc ou 2-6 domínios Fc. Em algumas modalidades, o construto de Fc inclui 2-4 domínios Fc. Em algumas modalidades, o construto de Fc inclui 5-10 domínios Fc (por exemplo, 5-6, 5-7, 5-8, 5-9, ou 5-10 domínios Fc).

[005] Em algumas modalidades, os construtos (por exemplo, construtos de Fc tendo 2-4 domínios Fc, por exemplo, 2, 3, ou 4 domí-

nios Fc) e composições farmacêuticas homogêneas (por exemplo, aquelas contendo construtos de Fc tendo 2-4 domínios Fc, por exemplo, 2, 3, ou 4 domínios Fc) da descrição são úteis, por exemplo, para reduzir a inflamação em um sujeito, para promover a depuração de autoanticorpos em um sujeito, para suprimir a apresentação de antígeno em um sujeito, para bloquear uma resposta imune, por exemplo, bloquear uma ativação baseada em imunocomplexos da resposta imune em um sujeito, e para tratar doenças imunológicas e inflamatórias (por exemplo, doenças autoimunes) em um sujeito. Os construtos de Fc descritos neste documento podem ser usados para tratar pacientes com doenças imunológicas e inflamatórias sem estimulação significativa de células do sistema imunológico. Em algumas modalidades, os construtos (por exemplo, construtos de Fc tendo 5-10 domínios Fc, por exemplo, 5, 6, 7, 8, 9, ou 10 domínios Fc) e composições farmacêuticas homogêneas (por exemplo, aquelas contendo construtos de Fc tendo 5-10 domínios Fc, por exemplo, 5, 6, 7, 8, 9, ou 10 domínios Fc) da descrição são úteis, por exemplo, para induzir a ativação de células imunológicas da resposta imune em um sujeito, para aumentar a fagocitose de uma célula alvo (isto é, uma célula cancerosa ou uma célula infectada) em um sujeito, e para tratar doenças, tais como cânceres e infecções em um sujeito.

[006] As propriedades desses construtos permitem a geração eficiente de composições substancialmente homogêneas. O grau de homogeneidade de uma composição influencia a farmacocinética e o desempenho in vivo da composição. Essa homogeneidade em uma composição é desejável a fim de garantir a segurança, eficácia, uniformidade e confiabilidade da composição. Um construto de Fc da descrição pode estar em uma composição ou população que seja substancialmente homogênea (por exemplo, pelo menos 85%, 90%, 95%, 98%, ou 99% homogênea).

[007] Conforme descrito em mais detalhes neste documento, a descrição apresenta composições substancialmente homogêneas contendo construtos de Fc em que todos têm o mesmo número de domínios Fc, bem como métodos de preparação dessas composições substancialmente homogêneas.

[008] Em um primeiro aspecto, a descrição apresenta um construto de Fc incluindo a) um primeiro polipeptídeo incluindo i) um primeiro monômero de domínio Fc; ii) um segundo monômero de domínio Fc; e iii) um peptídeo de ligação que une o primeiro monômero de domínio Fc ao segundo monômero de domínio Fc; b) um segundo polipeptídeo incluindo i) um terceiro monômero de domínio Fc; ii) um quarto monômero de domínio Fc; e iii) um peptídeo de ligação que une o terceiro monômero de domínio Fc ao quarto monômero de domínio Fc; c) um terceiro polipeptídeo inclui um quinto monômero de domínio Fc; e d) um quarto polipeptídeo inclui um sexto monômero de domínio Fc; em que o primeiro monômero de domínio Fc e o quinto monômero de domínio Fc se combinam para formar um primeiro domínio Fc, o segundo monômero de domínio Fc e o quarto monômero de domínio Fc se combinam para formar um segundo domínio Fc, e o terceiro monômero de domínio Fc e o sexto monômero de domínio Fc se combinam para formar um terceiro domínio Fc, e em que cada um dos primeiro e segundo polipeptídeos compreende a sequência

DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVS
HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPPEEQYNSTYRVVSVLTVLHQD
WLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIISKAKGQPREPVYTLPPCRDKLT
KNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPVLDSDGSFF
LYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKG
GGGGGGGGGGGGGGGGDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKP
KDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPPE
EQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIISKAK

GQPREPVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQ PENNYKTPPVLKSDGSFFLYSDLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEAL HNHYTQKSLSLSPG (SEQ ID NO: 76),

e cada um dos terceiro e quarto polipeptídeos compreende a sequência

DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVS HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPPEEQYNSTYRVVSVLTVLHQD WLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPVQLPPSRDELT KNQVSLSCAVDGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFF LVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG (SEQ ID NO: 70).

[009] Em outro aspecto, a descrição apresenta um construto de Fc incluindo a) um primeiro polipeptídeo incluindo i) um primeiro monômero de domínio Fc; ii) um segundo monômero de domínio Fc; e iii) um peptídeo de ligação que une o primeiro monômero de domínio Fc ao segundo monômero de domínio Fc; b) um segundo polipeptídeo incluindo i) um terceiro monômero de domínio Fc; ii) um quarto monômero de domínio Fc; e iii) um peptídeo de ligação que une o terceiro monômero de domínio Fc ao quarto monômero de domínio Fc; c) um terceiro polipeptídeo inclui um quinto monômero de domínio Fc; e d) um quarto polipeptídeo inclui um sexto monômero de domínio Fc; em que o primeiro monômero de domínio Fc e o quinto monômero de domínio Fc se combinam para formar um primeiro domínio Fc, o segundo monômero de domínio Fc e o quarto monômero de domínio Fc se combinam para formar um segundo domínio Fc, e o terceiro monômero de domínio Fc e o sexto monômero de domínio Fc se combinam para formar um terceiro domínio Fc, e em que pelo menos um domínio Fc inclui uma modificação de aminoácido na posição I253 (por exemplo, uma modificação de aminoácido único na posição I253). Em outro aspecto, a descrição apresenta um construto de Fc incluindo a) um

primeiro polipeptídeo incluindo i) um primeiro monômero de domínio Fc; ii) um segundo monômero de domínio Fc; e iii) um peptídeo de ligação que une o primeiro monômero de domínio Fc ao segundo monômero de domínio Fc; b) um segundo polipeptídeo incluindo i) um terceiro monômero de domínio Fc; ii) um quarto monômero de domínio Fc; e iii) um peptídeo de ligação que une o terceiro monômero de domínio Fc ao quarto monômero de domínio Fc; c) um terceiro polipeptídeo inclui um quinto monômero de domínio Fc; e d) um quarto polipeptídeo inclui um sexto monômero de domínio Fc; em que o primeiro monômero de domínio Fc e o quinto monômero de domínio Fc se combinam para formar um primeiro domínio Fc, o segundo monômero de domínio Fc e o quarto monômero de domínio Fc se combinam para formar um segundo domínio Fc, e o terceiro monômero de domínio Fc e o sexto monômero de domínio Fc se combinam para formar um terceiro domínio Fc, e em que pelo menos um monômero de domínio Fc inclui uma substituição de aminoácido na posição I253.

[0010] Em alguns casos, o primeiro e o segundo polipeptídeo são idênticos um ao outro e o terceiro e o quarto polipeptídeo são idênticos um ao outro. Em algumas modalidades, o primeiro domínio Fc inclui uma modificação de aminoácido na posição I253. Em alguns casos, um ou ambos dentre o primeiro e o quinto monômero de domínio Fc compreendem uma substituição de aminoácido na posição I253. Em algumas modalidades, o segundo domínio Fc inclui uma modificação de aminoácido na posição I253. Em algumas modalidades, um ou ambos dentre o segundo e o quarto monômero de domínio Fc compreendem uma substituição de aminoácido na posição I253. Em algumas modalidades, o terceiro domínio Fc inclui uma modificação de aminoácido na posição I253. Em algumas modalidades, um ou ambos dentre o terceiro e o sexto monômero de domínio Fc compreendem uma substituição de aminoácido na posição I253. Em algumas moda-

lidades, cada modificação de aminoácido (por exemplo, substituição) na posição I253 é independentemente selecionada do grupo consistindo em I253A, I253C, I253D, I253E, I253F, I253G, I253H, I253I, I253K, I253L, I253M, I253N, I253P, I253Q, I253R, I253S, I253T, I253V, I253W e I253Y. Em algumas modalidades, cada modificação de aminoácido (por exemplo, substituição) na posição I253 é I253A. Em algumas modalidades, o construto de Fc (por exemplo, pelo menos um monômero de domínio Fc) inclui pelo menos uma modificação de aminoácido na posição R292. Em algumas modalidades, pelo menos um monômero de domínio Fc inclui uma substituição de aminoácido na posição R292. Em algumas modalidades, o primeiro domínio Fc inclui uma modificação de aminoácido na posição R292. Em algumas modalidades, o primeiro domínio Fc (por exemplo, um ou ambos dentre o primeiro monômero de domínio Fc e o quinto monômero de domínio Fc) inclui uma substituição de aminoácido na posição R292. Em algumas modalidades, o segundo domínio Fc inclui uma modificação de aminoácido na posição R292. Em algumas modalidades, o segundo domínio Fc (por exemplo, um ou ambos dentre o segundo monômero de domínio Fc e o quarto monômero de domínio Fc) inclui uma substituição de aminoácido na posição R292. Em algumas modalidades, o terceiro domínio Fc inclui uma modificação de aminoácido na posição R292. Em algumas modalidades, o terceiro domínio Fc (por exemplo, um ou ambos dentre o terceiro monômero de domínio Fc e o sexto monômero de domínio Fc) inclui uma substituição de aminoácido na posição R292. Em algumas modalidades, cada um dentre os primeiro, segundo e terceiro domínios Fc inclui uma modificação de aminoácido (por exemplo, substituição) na posição R292. Em alguns casos, um ou ambos dentre o primeiro e o quinto monômero de domínio Fc compreendem uma substituição de aminoácido na posição R292, um ou ambos dentre o segundo e o quarto monômero de domínio Fc compreen-

dem uma substituição de aminoácido na posição R292, e um ou mais dentre o terceiro e o sexto monômero de domínio Fc compreendem uma substituição de aminoácido na posição R292. Em algumas modalidades, cada um dentre os primeiro, segundo e terceiro domínios Fc inclui a modificação de aminoácido (por exemplo, substituição) R292P. Em algumas modalidades, cada modificação de aminoácido (por exemplo, substituição) na posição R292 é independentemente selecionada do grupo consistindo em R292D, R292E, R292L, R292P, R292Q, R292R, R292T e R292Y. Em algumas modalidades, cada modificação de aminoácido (por exemplo, substituição) na posição R292 é R292P.

[0011] Em algumas modalidades de todos os aspectos, cada um dos domínios Fc é baseado em uma sequência Fc de IgG1 humana e inclui as modificações descritas neste documento (isto é, é uma variante de uma sequência Fc de IgG humana). Em algumas modalidades, a sequência de Fc de IgG1 base é a SEQ ID NO: 42 e inclui até 10 modificações de aminoácidos únicos. Em algumas modalidades, cada um dos domínios Fc dos construtos de Fc descritos neste documento é uma sequência Fc de IgG1 (por exemplo, SEQ ID NO: 42) com até 10 modificações de aminoácidos únicos. Em algumas modalidades, a sequência Fc de IgG1 é a SEQ ID NO: 42 e inclui as modificações de uma cavidade manipulada, protuberância manipulada e/ou modificações na direção eletrostática para controlar o conjunto dos polipeptídeos; e/ou modificações de mutações relacionadas à ligação para modificar a farmacocinética do construto, conforme descrito neste documento. Assim, as até 10 modificações de aminoácidos únicos podem incluir uma modificação (por exemplo, substituição) em um ou ambos dentre I253 (por exemplo, I253A) e R292 (por exemplo, R292P) e modificações (por exemplo, substituições) para fornecer: uma cavidade manipulada e protuberância manipulada, e/ou modificações na

direção eletrostática para controlar o conjunto dos polipeptídeos. Em alguns casos, cada monômero de domínio Fc compreende até 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 ou 1 modificações de aminoácidos únicos além de uma substituição em um ou ambos dentre I253 e R292. As modificações para fornecer uma cavidade manipulada, protuberância manipulada e/ou modificações na direção eletrostática para controlar o conjunto dos polipeptídeos estão preferencialmente no(s) domínio(s) CH3 de um domínio Fc.

[0012] Em outro aspecto, a descrição apresenta um construto de Fc, incluindo: a) um primeiro polipeptídeo incluindo: i). um primeiro monômero de domínio Fc; ii). um segundo monômero de domínio Fc; e iii) um peptídeo de ligação que une o primeiro monômero de domínio Fc ao segundo monômero de domínio Fc; b). um segundo polipeptídeo incluindo i). um terceiro monômero de domínio Fc; ii). um quarto monômero de domínio Fc; e iii) um peptídeo de ligação que une o terceiro monômero de domínio Fc ao quarto monômero de domínio Fc; c). um terceiro polipeptídeo inclui um quinto monômero de domínio Fc; e d). um quarto polipeptídeo inclui um sexto monômero de domínio Fc; em que o primeiro monômero de domínio Fc e o quinto monômero de domínio Fc se combinam para formar um primeiro domínio Fc, o segundo monômero de domínio Fc e o quarto monômero de domínio Fc se combinam para formar um segundo domínio Fc, e o terceiro monômero de domínio Fc e o sexto monômero de domínio Fc se combinam para formar um terceiro domínio Fc, e em que pelo menos um domínio Fc compreende uma modificação de aminoácido na posição R292 (por exemplo, uma modificação de aminoácido único). Em outro aspecto, a descrição apresenta um construto de Fc, incluindo: a) um primeiro polipeptídeo incluindo: i). um primeiro monômero de domínio Fc; ii). um segundo monômero de domínio Fc; e iii) um peptídeo de ligação que une o primeiro monômero de domínio Fc ao segundo monômero de

domínio Fc; b). um segundo polipeptídeo incluindo i). um terceiro monômero de domínio Fc; ii). um quarto monômero de domínio Fc; e iii) um peptídeo de ligação que une o terceiro monômero de domínio Fc ao quarto monômero de domínio Fc; c). um terceiro polipeptídeo inclui um quinto monômero de domínio Fc; e d). um quarto polipeptídeo inclui um sexto monômero de domínio Fc; em que o primeiro monômero de domínio Fc e o quinto monômero de domínio Fc se combinam para formar um primeiro domínio Fc, o segundo monômero de domínio Fc e o quarto monômero de domínio Fc se combinam para formar um segundo domínio Fc, e o terceiro monômero de domínio Fc e o sexto monômero de domínio Fc se combinam para formar um terceiro domínio Fc, e em que pelo menos um monômero de domínio Fc comprehende uma substituição de aminoácido na posição R292.

[0013] Em algumas modalidades, o primeiro domínio Fc inclui uma modificação de aminoácido na posição R292. Em algumas modalidades, um ou ambos dentre o primeiro e o quinto monômero de domínio Fc comprehendem uma substituição de aminoácido na posição R292. Em algumas modalidades, o segundo domínio Fc inclui uma modificação de aminoácido na posição R292. Em algumas modalidades, um ou ambos dentre o segundo e o quarto monômero de domínio Fc comprehendem uma substituição de aminoácido na posição R292. Em algumas modalidades, o terceiro domínio Fc inclui uma modificação de aminoácido na posição R292. Em algumas modalidades, um ou ambos dentre o terceiro e o sexto monômero de domínio Fc comprehendem uma substituição de aminoácido na posição R292. Em algumas modalidades, cada um dentre os primeiro, segundo e terceiro domínios Fc inclui uma modificação de aminoácido (por exemplo, substituição) na posição R292. Em algumas modalidades, cada um dentre os primeiro, segundo e terceiro domínios Fc inclui a modificação de aminoácido (por exemplo, substituição) R292P (isto é, cada monômero de Fc

tem modificação R292P, por exemplo, em comparação com SEQ ID NO:42). Em algumas modalidades, um ou ambos dentre o primeiro e o quinto monômero de domínio Fc incluem a substituição de aminoácido R292P, um ou ambos dentre o segundo e o quarto monômero de domínio Fc incluem substituição de aminoácido R292P, e um ou ambos dentre o terceiro e o sexto monômero de domínio Fc incluem a substituição de aminoácido R292P.

[0014] Em algumas modalidades, cada modificação de aminoácido (por exemplo, substituição) na posição R292 é independentemente selecionada dentre R292D, R292E, R292L, R292P, R292Q, R292R, R292T ou R292Y. Em algumas modalidades, cada modificação de aminoácido (por exemplo, substituição) na posição R292 é R292P. Em algumas modalidades, cada um dentre o primeiro e o terceiro domínio Fc inclui a modificação de aminoácido (por exemplo, substituição) I253A, e cada um dentre os primeiro, segundo e terceiro domínios Fc inclui a modificação de aminoácido (por exemplo, substituição) R292P. Em algumas modalidades, um ou ambos dentre o primeiro e o quinto monômero de domínio Fc incluem a substituição de aminoácido I253A, um ou ambos dentre o terceiro e o sexto monômero de domínio Fc incluem a substituição de aminoácido I253A, um ou ambos dentre o primeiro e o quinto monômero de domínio Fc incluem a substituição de aminoácido R292P, um ou ambos dentre o segundo e o quarto monômero de domínio Fc incluem a substituição de aminoácido R292P, e um ou ambos dentre o terceiro e o sexto monômero de domínio Fc incluem a substituição de aminoácido R292P. Em algumas modalidades, cada um dentre os primeiros, segundo e terceiro domínios Fc inclui a modificação de aminoácido (por exemplo, substituição) I253A e R292P. Em algumas modalidades, um ou ambos dentre o primeiro e o quinto monômero de domínio Fc incluem a substituição de aminoácido I253A, um ou ambos dentre o segundo e o quarto monômero de domí-

nio Fc incluem a substituição de aminoácido I253A, e um ou ambos dentre o terceiro e o sexto monômero de domínio Fc incluem a substituição de aminoácido I253A, um ou ambos dentre o primeiro e o quinto monômero de domínio Fc incluem a substituição de aminoácido R292P, um ou ambos dentre o terceiro e o quarto monômero de domínio Fc incluem a substituição de aminoácido R292P, e um ou ambos dentre o terceiro e o sexto monômero de domínio Fc incluem a substituição de aminoácido R292P.

[0015] Em algumas modalidades, a sequência de cada domínio Fc é baseada em uma sequência de domínio Fc de IgG1 humana com não mais que dez modificações de aminoácidos únicos. Em algumas modalidades, a sequência de cada domínio Fc se baseia na SEQ ID NO: 42 com não mais que dez modificações de aminoácidos únicos.

[0016] Em algumas modalidades, cada um dentre o primeiro domínio Fc e o terceiro domínio Fc inclui as substituições de aminoácidos I253A e R292P, e o segundo domínio Fc inclui a substituição de aminoácido R292P. Em alguns casos, um ou ambos dentre o primeiro e o quinto monômero de domínio Fc compreendem a substituição de aminoácido I253A; um ou ambos dentre o primeiro e o quinto monômero de domínio Fc compreendem a substituição de aminoácido R292P; um ou ambos dentre o terceiro e o sexto monômero de domínio Fc compreendem a substituição de aminoácido I253A; um ou ambos dentre o terceiro e o sexto monômero de domínio Fc compreendem a substituição de aminoácido R292P; e um ou ambos dentre o segundo e o quarto monômero de domínio Fc compreendem a substituição de aminoácido R292P.

[0017] Em algumas modalidades, o segundo domínio Fc inclui a substituição de aminoácido I253A. Em algumas modalidades, um ou ambos dentre o segundo e o quarto monômero de domínio Fc compreendem a substituição de aminoácido I253A. Em algumas modali-

dades, cada um dentre o primeiro domínio Fc e o terceiro domínio Fc inclui a substituição de aminoácido I253A. Em algumas modalidades, um ou ambos dentre o primeiro e o quinto monômero de domínio Fc compreendem a substituição de aminoácido I253A e um ou ambos dentre o terceiro e o sexto monômero de domínio Fc compreendem a substituição de aminoácido I253A. Em algumas modalidades, cada um dentre o primeiro domínio Fc, o segundo domínio Fc e o terceiro domínio Fc compreende a substituição de aminoácido I253A. Em algumas modalidades, um ou ambos dentre o primeiro e o quinto monômero de domínio Fc compreendem a substituição de aminoácido I253A, um ou ambos dentre o segundo e o quarto monômero de domínio Fc compreendem a substituição de aminoácido I253A e um ou ambos dentre o terceiro e o sexto monômero de domínio Fc compreendem a substituição de aminoácido I253A.

[0018] Em algumas modalidades, o segundo domínio Fc inclui a substituição de aminoácido R292P. Em algumas modalidades, um ou ambos dentre o segundo e o quarto monômero de domínio Fc compreendem a substituição de aminoácido R292P. Em algumas modalidades, o segundo domínio Fc inclui as substituições de aminoácidos I253A e R292P. Em algumas modalidades, um ou ambos dentre o segundo e o quarto monômero de domínio Fc compreendem a substituição de aminoácido I253A, e um ou ambos dentre o segundo e o quarto monômero de domínio Fc compreendem a substituição de aminoácido R292P. Em algumas modalidades, cada um dentre o primeiro domínio Fc e o terceiro domínio Fc inclui a substituição de aminoácido I253A e o segundo domínio Fc inclui a substituição de aminoácido R292P. Em algumas modalidades, um ou ambos dentre o primeiro e o quinto monômero de domínio Fc compreendem a substituição de aminoácido I253A; um ou ambos dentre o terceiro e o sexto monômero de domínio Fc compreendem a substituição de aminoácido I253A; e um ou ambos

dentre o segundo e o quarto monômero de domínio Fc compreendem a substituição de aminoácido R292P.

[0019] Em algumas modalidades, cada um dentre o primeiro domínio Fc e o terceiro domínio Fc inclui a substituição de aminoácido I253A e o segundo domínio Fc inclui a substituição de aminoácido I253A e R292P. Em algumas modalidades, um ou ambos dentre o primeiro e o quinto monômero de domínio Fc compreendem a substituição de aminoácido I253A; um ou ambos dentre o terceiro e o sexto monômero de domínio Fc compreendem a substituição de aminoácido I253A; um ou ambos dentre o segundo e o quarto monômero de domínio Fc compreendem a substituição de aminoácido I253A; e um ou ambos dentre o segundo e o quarto monômero de domínio Fc compreendem a substituição de aminoácido R292P. Em algumas modalidades, cada um dentre o primeiro domínio Fc e o terceiro domínio Fc inclui a substituição de aminoácido R292P. Em algumas modalidades, um ou ambos dentre o primeiro e o quinto monômero de domínio Fc compreendem a substituição de aminoácido R292P e um ou ambos dentre o terceiro e o sexto monômero de domínio Fc compreendem a substituição de aminoácido R292P.

[0020] Em algumas modalidades, o primeiro domínio Fc e o terceiro domínio Fc incluem a substituição de aminoácido R292P e o segundo domínio Fc inclui a substituição de aminoácido I253A. Em algumas modalidades, um ou ambos dentre o primeiro e o quinto monômero de domínio Fc compreendem a substituição de aminoácido R292P; um ou ambos dentre o terceiro e o sexto monômero de domínio Fc compreendem a substituição de aminoácido R292P; e um ou ambos dentre o segundo e o quarto monômero de domínio Fc compreendem a substituição de aminoácido I253A. Em algumas modalidades, cada um dentre o primeiro domínio Fc e o terceiro domínio Fc inclui I253A e R292P (por exemplo, inclui as substituições de aminoácidos I253A e R292P).

Em algumas modalidades, um ou ambos dentre o primeiro e o quinto monômero de domínio Fc compreendem a substituição de aminoácido I253A; um ou ambos dentre o primeiro e o quinto monômero de domínio Fc compreendem a substituição de aminoácido R292P; um ou ambos o terceiro e o sexto monômero de domínio Fc compreendem a substituição de aminoácido I253A; e um ou ambos dentre o terceiro e o sexto domínio Fc compreendem a substituição de aminoácido R292P.

[0021] Em algumas modalidades, cada um dentre o primeiro domínio Fc e o terceiro domínio Fc compreende as substituições de aminoácidos I253A e R292P, e em que o segundo domínio Fc comprehende a substituição de aminoácido I253A. Em algumas modalidades, um ou ambos dentre o primeiro e o quinto monômero de domínio Fc compreendem a substituição de aminoácido I253A; um ou ambos dentre o primeiro e o quinto monômero de domínio Fc compreendem a substituição de aminoácido R292P; um ou ambos dentre o terceiro e o sexto monômero de domínio Fc compreendem a substituição de aminoácido I253A; um ou ambos dentre o terceiro e o sexto monômero de domínio Fc compreendem a substituição de aminoácido R292P; e um ou ambos dentre o segundo e o quarto monômero de domínio Fc comprehendem a substituição de aminoácido I253A. Em algumas modalidades, cada um dentre o primeiro domínio Fc, o segundo domínio Fc e o terceiro domínio Fc inclui a substituição de aminoácido R292P. Em algumas modalidades, um ou ambos dentre o primeiro e o quinto monômero de domínio Fc compreendem a substituição de aminoácido R292P; um ou ambos dentre o segundo e o quarto monômero de domínio Fc compreendem a substituição de aminoácido R292P; e um ou ambos dentre o terceiro e o sexto domínio Fc compreendem a substituição de aminoácido R292P.

[0022] Em algumas modalidades, cada um dentre o primeiro do-

mínio Fc e o terceiro domínio Fc compreende a substituição de aminoácido R292P, e em que o segundo domínio Fc compreende as substituições de aminoácidos I253A e R292P. Em algumas modalidades, um ou ambos dentre o primeiro e o quinto monômero de domínio Fc compreendem a substituição de aminoácido R292P; um ou ambos dentre o terceiro e o sexto monômero de domínio Fc compreendem a substituição de aminoácido R292P; um ou ambos dentre o segundo e o quarto monômero de domínio Fc compreendem a substituição de aminoácido I253A; e um ou ambos dentre o segundo e o quarto monômero de domínio Fc compreendem a substituição de aminoácido R292P. Em algumas modalidades, cada um dentre o primeiro domínio Fc, o segundo domínio Fc e o terceiro domínio Fc compreende as substituições de aminoácidos I253A e R292P. Em algumas modalidades, um ou ambos dentre o primeiro e o quinto monômero de domínio Fc compreendem a substituição de aminoácido I253A; um ou ambos dentre o primeiro e o quinto monômero de domínio Fc compreendem a substituição de aminoácido R292P; um ou ambos dentre o segundo e o quarto monômero de domínio Fc compreendem a substituição de aminoácido I253A; um ou ambos dentre o segundo e o quarto monômero de domínio Fc compreendem a substituição de aminoácido R292P; um ou ambos dentre o terceiro e o sexto monômero de domínio Fc compreendem a substituição de aminoácido I253A; e um ou ambos dentre o terceiro e o sexto domínio Fc compreendem a substituição de aminoácido R292P.

[0023] Em algumas modalidades, o primeiro monômero de domínio Fc e o quinto monômero de domínio Fc incluem módulos de seletividade de dimerização complementares que promovem a dimerização entre o primeiro monômero de domínio Fc e o quinto monômero de domínio Fc. Em algumas modalidades, o segundo monômero de domínio Fc e o quarto monômero de domínio Fc incluem módulos de se-

letividade de dimerização complementares que promovem a dimerização entre o segundo monômero de domínio Fc e o quarto monômero de domínio Fc. Em algumas modalidades, o terceiro monômero de domínio Fc e o sexto monômero de domínio Fc incluem módulos de seletividade de dimerização complementares que promovem a dimerização entre o terceiro monômero de domínio Fc e o sexto monômero de domínio Fc. Em algumas modalidades, o primeiro polipeptídeo e o segundo polipeptídeo compreendem, consistem em, ou consistem essencialmente na mesma sequência de aminoácidos e em que o terceiro polipeptídeo e o quarto polipeptídeo compreendem, consistem em, ou consistem essencialmente na mesma sequência de aminoácidos. Em algumas modalidades, cada um dentre o segundo monômero de domínio Fc e o quarto monômero de domínio Fc inclui D399K e ou K409D ou K409E. Em algumas modalidades, cada um dentre o segundo monômero de domínio Fc e o quarto monômero de domínio Fc inclui K392D e D399K. Em algumas modalidades, cada um dentre o segundo monômero de domínio Fc e o quarto monômero de domínio Fc inclui E357K e K370E. Em algumas modalidades, cada um dentre o segundo monômero de domínio Fc e o quarto monômero de domínio Fc inclui D356K e K439D. Em algumas modalidades, cada um dentre o segundo monômero de domínio Fc e o quarto monômero de domínio Fc inclui K392E e D399K. Em algumas modalidades, cada um dentre o segundo monômero de domínio Fc e o quarto monômero de domínio Fc inclui E357K e K370D. Em algumas modalidades, cada um dentre o segundo monômero de domínio Fc e o quarto monômero de domínio Fc inclui D356K e K439E. Em algumas modalidades, cada um dentre o primeiro monômero de domínio Fc e o terceiro monômero de domínio Fc inclui S354C e T366W e o quinto monômero de domínio Fc e o sexto monômero de domínio Fc incluem, cada um, Y349C, T366S, L368A e Y407V. Em algumas modalidades, cada um dentre o terceiro

e o quarto polipeptídeo inclui S354C e T366W e o primeiro monômero de domínio Fc e o terceiro monômero de domínio Fc incluem, cada um, Y349C, T366S, L368A e Y407V. Em algumas modalidades, cada um dentre o primeiro monômero de domínio Fc e o terceiro monômero de domínio Fc inclui E357K ou E357R e o quinto monômero de domínio Fc e o sexto monômero de domínio Fc incluem, cada um, K370D ou K370E. Em algumas modalidades, o primeiro monômero de domínio Fc e o terceiro monômero de domínio Fc incluem K370D ou K370E e o quinto monômero de domínio Fc e o sexto monômero de domínio Fc incluem, cada um, E357K ou E357R. Em algumas modalidades, cada um dentre o primeiro monômero de domínio Fc e o terceiro monômero de domínio Fc inclui K409D ou K409E e o quinto monômero de domínio Fc e o sexto monômero de domínio Fc incluem, cada um, D399K ou D399R. Em algumas modalidades, o primeiro monômero de domínio Fc e o terceiro monômero de domínio Fc incluem D399K ou D399R e o quinto monômero de domínio Fc e o sexto monômero de domínio Fc incluem, cada um, K409D ou K409E.

[0024] Em algumas modalidades, o peptídeo de ligação (por exemplo, espaçador) inclui um polipeptídeo tendo a sequência GGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGG (SEQ ID NO: 23), GGGGS (SEQ ID NO: 1), GGSG (SEQ ID NO: 2), SGGS (SEQ ID NO: 3), GSGS (SEQ ID NO: 4), GSGSGS (SEQ ID NO: 5), GSGSGSGS (SEQ ID NO: 6), GSGSGSGSGS (SEQ ID NO: 7), GSGSGSGSGSGS (SEQ ID NO: 8), GGSGGS (SEQ ID NO: 9), GGSGGSGGS (SEQ ID NO: 10), GGSGGSGGSGGS (SEQ ID NO: 11), GGSGGGSG (SEQ ID NO: 12), GGSGGGSGGGSG (SEQ ID NO: 13), GGSGGGSGGGSGGGSG (SEQ ID NO: 14), GGSGGGSGGGSGGGSGGGSG (SEQ ID NO: 80), GENLYFQSGG (SEQ ID NO: 28), SACYCELS (SEQ ID NO: 29), RSIAT (SEQ ID NO: 30), RPACKIPNDLKQKVMNH (SEQ ID NO: 31),

GGSAGGSGSGSSGGSSGASGTGTAGGTGSGSGTGSG (SEQ ID NO: 32), AAANSSIDLISVPVDSR (SEQ ID NO: 33), GGSGGGSEGGGSEGGGSEGGGSEGGGSEGGGSGGGS (SEQ ID NO: 34), GGGSGGGSGGGS (SEQ ID NO: 35), SGGGSGGGSGGGS (SEQ ID NO: 18), GGSGGGSGGGSGGGSGGS (SEQ ID NO: 36), GGGG (SEQ ID NO: 19), GGGGGGGGG (SEQ ID NO: 20), GGGGGGGGGGGGG (SEQ ID NO: 21), ou GGGGGGGGGGGGGGGGG (SEQ ID NO: 22). Em outras modalidades, um ou mais peptídeos de ligação num construto de Fc descrito neste documento é um espaçador, por exemplo, um espaçador de aminoácidos de 2-200 aminoácidos (por exemplo, 2-100, 3-200, 3-150, 3-100, 3-60, 3-50, 3-40, 3-30, 3-20, 3-10, 3-8, 3-5, 4-30, 5-30, 6-30, 8-30, 10-20, 10-30, 12-30, 14-30, 20-30, 15-25, 15-30, 18-22 e 20-30 aminoácidos). Em alguns casos, o espaçador de aminoácidos inclui apenas glicina, apenas serina, ou apenas serina e glicina. Em algumas modalidades, o espaçador de aminoácidos inclui apenas glicina.

[0025] Em algumas modalidades, cada um dentre o primeiro polipeptídeo e o segundo polipeptídeo compreende, consiste em, ou consiste essencialmente na sequência

DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMASRTPEVTCVVVDVS
HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPPEEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPVYTLPPCRDKLT
KNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKG
GGGGGGGGGGGGGGDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPPE
EQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQ
PENNYKTPVLDSDGSFFLYSDLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEAL

HNHYTQKSLSLSPG (SEQ ID NO: 78). Em algumas modalidades, cada um dentre o primeiro polipeptídeo e o segundo polipeptídeo compreende, consiste em, consiste essencialmente na sequência DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMASRTPEVTCVVVDVS HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPPEEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCRDKLT KNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFF LYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKGGS GGGGGGGGGGGGGGGGGDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKP KDTLMISRTPEVTCVVVDVSCHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPPE EQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK GQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQ PENNYKTPPVLDSDGSFFLYSDLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEAL HNHYTQKSLSLSPG (SEQ ID NO: 78) com até 10 (9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2, ou 1) modificações de aminoácidos únicos (por exemplo, substituições, por exemplo, substituições conservativas). Em algumas modalidades, cada um dentre o primeiro polipeptídeo e o segundo polipeptídeo compreende, consiste em, ou consiste essencialmente na sequência da SEQ ID NO: 78 com até 10 (por exemplo, não mais que 1, não mais que 2, não mais que 3, não mais que 4, não mais que 5, não mais que 6, não mais que 7, não mais que 8, não mais que 9) modificações de aminoácidos únicos na região fora do peptídeo de ligação (por exemplo, fora da subsequência GGGGGGGGGGGGGGGGGGGGG (SEQ ID NO: 23). O peptídeo de ligação dentro da SEQ ID NO:78 pode ser substituído por um peptídeo de ligação alternativo. Em algumas modalidades, cada um dentre o primeiro polipeptídeo e o segundo polipeptídeo compreende, consiste em, ou consiste essencialmente na sequência da SEQ ID NO: 78 com até 10 modificações de aminoácidos únicos, contanto que a posição 33 da SEQ ID NO: 78 seja alanina, a posição 72 da SEQ ID NO: 78

seja prolina e a posição 319 da SEQ ID NO: 78 seja prolina.

[0026] Em algumas modalidades, cada um dentre o primeiro polipeptídeo e o segundo polipeptídeo compreende, consiste em, ou consiste essencialmente na sequência

DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVS
HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCRDKLT
KNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKG
GGGGGGGGGGGGGGGGDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTPRE
EQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQ
PENNYKTTPPVLKSDGSFFLYSDLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG (SEQ ID NO: 49). Em algumas modalidades, cada um dentre o primeiro polipeptídeo e o segundo polipeptídeo compreende, consiste em, ou consiste essencialmente na sequência da SEQ ID NO: 49 com até 10 (por exemplo, até 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 ou 1) modificações de aminoácidos únicos (por exemplo, substituições, por exemplo, substituições conservativas). Em algumas modalidades, cada um dentre o primeiro polipeptídeo e o segundo polipeptídeo compreende, consiste em, ou consiste essencialmente na sequência da SEQ ID NO: 49 com até 10 modificações de aminoácidos únicos, contanto que nenhum das até 10 (por exemplo, não mais do que 1, não mais do que 2, não mais do que 3, não mais do que 4, não mais do que 5, não mais do que 6, não mais do que 7, não mais do que 8, não mais do que 9) modificações de aminoácidos únicos na região fora do peptídeo de ligação (por exemplo, fora da subsequência GGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGG (SEQ ID NO: 23). O peptídeo de ligação dentro da SEQ ID NO:49 pode ser substituído por um peptídeo

de ligação alternativo. Em algumas modalidades, cada um dentre o primeiro polipeptídeo e o segundo polipeptídeo compreende, consiste em, ou consiste essencialmente na sequência da SEQ ID NO: 49 com até 10 modificações de aminoácidos únicos, contanto que a posição 134 da SEQ ID NO: 49 seja cisteína, a posição 137 da SEQ ID NO: 49 seja lisina, a posição 146 da SEQ ID NO: 49 seja triptofano, a posição 426 da SEQ ID NO: 49 seja lisina e a posição 436 da SEQ ID NO: 49 seja ácido aspártico.

[0027] Em algumas modalidades, cada um dentre o primeiro polipeptídeo e o segundo polipeptídeo compreende a sequência DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVS HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCRDKLT KNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFF LYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKG GGGGGGGGGGGGGGGDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKP KDTLMASRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTPRE EQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK GQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQ PENNYKTTPPVLKSDGSFFLYSDLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEAL HNHYTQKSLSLSPG (SEQ ID NO: 62). Em algumas modalidades, cada um dentre o primeiro polipeptídeo e o segundo polipeptídeo compreende, consiste em, ou consiste essencialmente na sequência da SEQ ID NO: 62 com até 10 (por exemplo, até 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 ou 1) modificações de aminoácidos únicos (por exemplo, substituições, por exemplo, substituições conservativas). Em algumas modalidades, cada um dentre o primeiro polipeptídeo e o segundo polipeptídeo compreende, consiste em, ou consiste essencialmente na sequência da SEQ ID NO: 62 com até 10 (por exemplo, não mais que 1, não mais que 2, não mais que 3, não mais que 4, não mais que 5, não mais que

6, não mais que 7, não mais que 8, não mais que 9) modificações de aminoácidos únicos na região foram do peptídeo de ligação (por exemplo, fora da subsequência GGGGGGGGGGGGGGGGGGGGG (SEQ ID NO: 23). O peptídeo de ligação dentro da SEQ ID NO:62 pode ser substituído por um peptídeo de ligação alternativo. Em algumas modalidades, cada um dentre o primeiro polipeptídeo e o segundo polipeptídeo compreende, consiste em, ou consiste essencialmente na sequência da SEQ ID NO: 62 com até 10 modificações de aminoácidos únicos, contanto que a posição 134 da SEQ ID NO: 62 seja cisteína, a posição 137 da SEQ ID NO: 62 seja lisina, a posição 146 da SEQ ID NO: 62 seja triptofano, a posição 280 da SEQ ID NO: 62 seja alanina, a posição 426 da SEQ ID NO: 62 seja lisina e a posição 436 da SEQ ID NO: 62 seja ácido aspártico.

[0028] Em algumas modalidades, cada um dentre o primeiro polipeptídeo e o segundo polipeptídeo compreende a sequência DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMASRTPEVTCVVVDVS HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPVYTLPPCRDKLT KNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFF LYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKG GGGGGGGGGGGGGGGGDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPK DTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK GQPREPVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSDLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG (SEQ ID NO: 64). Em algumas modalidades, cada um dentre o primeiro polipeptídeo e o segundo polipeptídeo compreende, consiste em, ou consiste essencialmente na sequência SEQ ID NO: 64 com até 10 (por exemplo, não mais que 1, não mais que 2, não mais que 3, não mais que 4, não mais que 5, não mais que

6, não mais que 7, não mais que 8, não mais que 9) modificações de aminoácidos únicos (por exemplo, substituições, por exemplo, substituições conservativas). Em algumas modalidades, cada um dentre o primeiro polipeptídeo e o segundo polipeptídeo compreende, consiste em, ou consiste essencialmente na sequência da SEQ ID NO: 64 com até 10 modificações de aminoácidos únicos na região fora do peptídeo de ligação (por exemplo, fora da subsequência GGGGGGGGGGGGGGGGGGGGG (SEQ ID NO: 23). O peptídeo de ligação dentro da SEQ ID NO: 64 pode ser substituído por um peptídeo de ligação alternativo. Em algumas modalidades, cada um dentre o primeiro polipeptídeo e o segundo polipeptídeo compreende, consiste em, ou consiste essencialmente na sequência da SEQ ID NO: 64 com até 10 modificações de aminoácidos únicos, contanto que a posição 33 da SEQ ID NO: 64 seja alanina.

[0029] Em algumas modalidades, cada um dentre o primeiro polipeptídeo e o segundo polipeptídeo compreende, consiste em, ou consiste essencialmente na sequência

DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMASRTPEVTCVVVDVS
HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIISKAKGQPREPQVYTLPPCRDKLT
KNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFF
LYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKGGG
GGGGGGGGGGGGGGGGDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKP
KDTLMASRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPRE
EQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIISKAK
GQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQ
PENNYKTPPVLDGSFFLYSDLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEAL
HNHYTQKSLSLSPG (SEQ ID NO: 65). Em algumas modalidades, cada um dentre o primeiro polipeptídeo e o segundo polipeptídeo compreende, consiste em, ou consiste essencialmente na sequência

SEQ ID NO: 65 com até 10 (por exemplo, até 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 ou 1) modificações de aminoácidos únicos (por exemplo, substituições, por exemplo, substituições conservativas). Em algumas modalidades, cada um dentre o primeiro polipeptídeo e o segundo polipeptídeo compreende, consiste em, ou consiste essencialmente na sequência da SEQ ID NO: 65 com até 10 (por exemplo, não mais que 1, não mais que 2, não mais que 3, não mais que 4, não mais que 5, não mais que 6, não mais que 7, não mais que 8, não mais que 9) modificações de aminoácidos únicos na região fora do peptídeo de ligação (por exemplo, a subsequência GGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGG (SEQ ID NO: 23). O peptídeo de ligação dentro da SEQ ID NO:65 pode ser substituído por um peptídeo de ligação alternativo. Em algumas modalidades, cada um dentre o primeiro polipeptídeo e o segundo polipeptídeo compreende, consiste em, ou consiste essencialmente na sequência da SEQ ID NO: 65 com até 10 modificações de aminoácidos únicos, contanto que a posição 33 da SEQ ID NO: 65 seja alanina, a posição 134 da SEQ ID NO: 65 seja cisteína, a posição 137 da SEQ ID NO: 65 seja lisina, a posição 146 da SEQ ID NO: 65 seja triptofano, a posição 280 da SEQ ID NO: 65 seja alanina, a posição 426 da SEQ ID NO: 65 seja lisina e a posição 436 da SEQ ID NO: 65 seja ácido aspártico.

[0030] Em algumas modalidades, cada um dentre o primeiro polipeptídeo e o segundo polipeptídeo compreende, consiste em, ou consiste essencialmente na sequência

DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVS
HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIISKAKGQPREPVYTLPPCRDKLT
KNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFF
LYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKG
GGGGGGGGGGGGGGGGDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKP
KDTLMISRTPEVTCVVVDVS
HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPPE

EQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTI SKAK GQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQ PENNYKTPPVLSKSDGSFFLYSDLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEAL HNHYTQKSLSLSPG (SEQ ID NO: 66). Em algumas modalidades, cada um dentre o primeiro polipeptídeo e o segundo polipeptídeo compreende, consiste em, ou consiste essencialmente na sequência SEQ ID NO: 66 com até 10 (por exemplo, não mais que 1, não mais que 2, não mais que 3, não mais que 4, não mais que 5, não mais que 6, não mais que 7, não mais que 8, não mais que 9) modificações de aminoácidos únicos (por exemplo, substituições, por exemplo, substituições conservativas). Em algumas modalidades, cada um dentre o primeiro polipeptídeo e o segundo polipeptídeo compreende, consiste em, ou consiste essencialmente na sequência da SEQ ID NO: 66 com até 10 modificações de aminoácidos únicos na região fora do peptídeo de ligação (por exemplo, fora da subsequência GGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGG (SEQ ID NO: 23). O peptídeo de ligação dentro da SEQ ID NO:66 pode ser substituído por um peptídeo de ligação alternativo. Em algumas modalidades, cada um dentre o primeiro polipeptídeo e o segundo polipeptídeo compreende, consiste em, ou consiste essencialmente na sequência da SEQ ID NO: 66 com até 10 modificações de aminoácidos únicos, contanto que a posição 134 da SEQ ID NO: 66 seja cisteína, a posição 137 da SEQ ID NO: 66 seja lisina, a posição 146 da SEQ ID NO: 66 seja triptofano, a posição 319 da SEQ ID NO: 66 seja prolina, a posição 426 da SEQ ID NO: 66 seja lisina e a posição 436 da SEQ ID NO: 66 seja ácido aspártico.

[0031] Em algumas modalidades, cada um dentre o primeiro polipeptídeo e o segundo polipeptídeo compreende, consiste em, ou consiste essencialmente na sequência

DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVS
HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQD

WLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTI SKAKGQPREPQVYTLPPCRDKLT
KNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFF
LYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKG
GGGGGGGGGGGGGGGGDKTHCPCPAPELLGGPSVFLFPPKP
KDTLMASRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPPE
EQYNSTYRVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTI SKAK
GQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQ
PENNYKTTPPVLKSDGSFFLYSDLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEAL
HNHYTQKSLSLSPG (SEQ ID NO: 67). Em algumas modalidades,
cada um dentre o primeiro polipeptídeo e o segundo polipeptídeo
compreende, consiste em, ou consiste essencialmente na sequência
SEQ ID NO: 67 com até 10 (por exemplo, até 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 ou 1)
modificações de aminoácidos únicos (por exemplo, substituições, por
exemplo, substituições conservativas). Em algumas modalidades, ca-
da um dentre o primeiro polipeptídeo e o segundo polipeptídeo com-
preende, consiste em, ou consiste essencialmente na sequência da
SEQ ID NO: 67 com até 10 (por exemplo, não mais que 1, não mais
que 2, não mais que 3, não mais que 4, não mais que 5, não mais que
6, não mais que 7, não mais que 8, não mais que 9) modificações de
aminoácidos únicos na região fora do peptídeo de ligação (por exem-
plo, a subsequência GGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGG
(SEQ ID NO:
23). O peptídeo de ligação dentro da SEQ ID NO:67 pode ser substi-
tuído por um peptídeo de ligação alternativo. Em algumas modalida-
des, cada um dentre o primeiro polipeptídeo e o segundo polipeptídeo
compreende, consiste em, ou consiste essencialmente na sequência
da SEQ ID NO: 67 com até 10 modificações de aminoácidos únicos,
contanto que a posição 134 da SEQ ID NO: 67 seja cisteína, a posição
137 da SEQ ID NO: 67 seja lisina, a posição 146 da SEQ ID NO: 67
seja triptofano, a posição 280 da SEQ ID NO: 67 seja alanina, a posi-
ção 318 da SEQ ID NO: 67 seja prolina, a posição 426 da SEQ ID NO:

67 seja lisina e a posição 436 da SEQ ID NO: 67 seja ácido aspártico.

[0032] Em algumas modalidades, cada um dentre o primeiro polipeptídeo e o segundo polipeptídeo compreende, consiste em, ou consiste essencialmente na sequência

DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMASRTPEVTCVVVDVS
HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCRDKLT
KNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKG
GGGGGGGGGGGGGGGGDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTPPE
EQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQ
PENNYKTTPPVLKSDGSFFLYSDLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG (SEQ ID NO: 68). Em algumas modalidades, cada um dentre o primeiro polipeptídeo e o segundo polipeptídeo compreende, consiste em, ou consiste essencialmente na sequência da SEQ ID NO: 68 com até 10 (por exemplo, até 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 ou 1) modificações de aminoácidos únicos (por exemplo, substituições, por exemplo, substituições conservativas). Em algumas modalidades, cada um dentre o primeiro polipeptídeo e o segundo polipeptídeo compreende, consiste em, ou consiste essencialmente na sequência da SEQ ID NO: 68 com até 10 (por exemplo, não mais que 1, não mais que 2, não mais que 3, não mais que 4, não mais que 5, não mais que 6, não mais que 7, não mais que 8, não mais que 9) modificações de aminoácidos únicos na região fora do peptídeo de ligação (por exemplo, a subsequência GGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGG (SEQ ID NO: 23). O peptídeo de ligação dentro da SEQ ID NO:68 pode ser substituído por um peptídeo de ligação alternativo. Em algumas modalidades, cada um dentre o primeiro polipeptídeo e o segundo polipeptídeo

compreende, consiste em, ou consiste essencialmente na sequência da SEQ ID NO: 68 com até 10 modificações de aminoácidos únicos, contanto que a posição 33 da SEQ ID NO: 68 seja alanina, a posição 134 da SEQ ID NO: 68 seja cisteína, a posição 137 da SEQ ID NO: 68 seja lisina, a posição 146 da SEQ ID NO: 68 seja triptofano, a posição 319 da SEQ ID NO: 68 seja prolina, a posição 426 da SEQ ID NO: 68 seja lisina e a posição 436 da SEQ ID NO: 68 seja ácido aspártico.

[0033] Em algumas modalidades, cada um dentre o primeiro polipeptídeo e o segundo polipeptídeo comprehende, consiste em, ou consiste essencialmente na sequência

DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMASRTPEVTCVVVDVS
HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCRDKLT
KNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFF
LYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKG
GGGGGGGGGGGGGGGGDKTHCTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKP
KDTLMASRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTPPE
EQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK
GQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQ
PENNYKTTPPVLKSDGSFFLYSDLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEAL
HNHYTQKSLSLSPG (SEQ ID NO: 69). Em algumas modalidades, cada um dentre o primeiro polipeptídeo e o segundo polipeptídeo comprehende, consiste em, ou consiste essencialmente na sequência da SEQ ID NO: 69 com até 10 (por exemplo, até 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 ou 1) modificações de aminoácidos únicos (por exemplo, substituições, por exemplo, substituições conservativas). Em algumas modalidades, cada um dentre o primeiro polipeptídeo e o segundo polipeptídeo comprehende, consiste em, ou consiste essencialmente na sequência da SEQ ID NO: 69 com até 10 (por exemplo, não mais que 1, não mais que 2, não mais que 3, não mais que 4, não mais que 5, não mais que

6, não mais que 7, não mais que 8, não mais que 9) modificações de aminoácidos únicos na região fora do peptídeo de ligação (por exemplo, a subsequência GGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGG (SEQ ID NO: 23). O peptídeo de ligação dentro da SEQ ID NO:69 pode ser substituído por um peptídeo de ligação alternativo. Em algumas modalidades, cada um dentre o primeiro polipeptídeo e o segundo polipeptídeo compreende, consiste em, ou consiste essencialmente na sequência da SEQ ID NO: 69 com até 10 modificações de aminoácidos únicos, contanto que a posição 33 da SEQ ID NO: 69 seja alanina, a posição 134 da SEQ ID NO: 69 seja cisteína, a posição 137 da SEQ ID NO: 69 seja lisina, a posição 146 da SEQ ID NO: 69 seja triptofano, a posição 280 da SEQ ID NO: 69 seja alanina, a posição 319 da SEQ ID NO: 69 seja prolina, a posição 426 da SEQ ID NO: 69 seja lisina e a posição 436 da SEQ ID NO: 69 seja ácido aspártico.

[0034] Em algumas modalidades, cada um dentre o primeiro polipeptídeo e o segundo polipeptídeo compreende, consiste em, ou consiste essencialmente na sequência

DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVS
HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPPEEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPVYTLPPCRDKLT
KNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKG
GGGGGGGGGGGGGGGGDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKP
KDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKP
REEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK
GQPREPVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQ
PENNYKTPVLDSDGSFFLYSDLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEAL
HNHYTQKSLSLSPG (SEQ ID NO: 71). Em algumas modalidades, cada um dentre o primeiro polipeptídeo e o segundo polipeptídeo compreende, consiste em, ou consiste essencialmente na sequência

SEQ ID NO: 71 com até 10 (por exemplo, até 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 ou 1) modificações de aminoácidos únicos (por exemplo, substituições, por exemplo, substituições conservativas). Em algumas modalidades, cada um dentre o primeiro polipeptídeo e o segundo polipeptídeo compreende, consiste em, ou consiste essencialmente na sequência da SEQ ID NO: 71 com até 10 (por exemplo, não mais que 1, não mais que 2, não mais que 3, não mais que 4, não mais que 5, não mais que 6, não mais que 7, não mais que 8, não mais que 9) modificações de aminoácidos únicos na região fora do peptídeo de ligação (por exemplo, a subsequência GGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGG (SEQ ID NO: 23). O peptídeo de ligação dentro da SEQ ID NO:71 pode ser substituído por um peptídeo de ligação alternativo. Em algumas modalidades, cada um dentre o primeiro polipeptídeo e o segundo polipeptídeo compreende, consiste em, ou consiste essencialmente na sequência da SEQ ID NO: 71 com até 10 modificações de aminoácidos únicos, contanto que a posição 71 da SEQ ID NO: 71 seja prolina, a posição 134 da SEQ ID NO: 71 seja cisteína, a posição 137 da SEQ ID NO: 71 seja lisina, a posição 146 da SEQ ID NO: 71 seja triptofano, a posição 426 da SEQ ID NO: 71 seja lisina e a posição 436 da SEQ ID NO: 71 seja ácido aspártico.

[0035] Em algumas modalidades, cada um dentre o primeiro polipeptídeo e o segundo polipeptídeo compreende, consiste em, ou consiste essencialmente na sequência

DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVS
HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPPEEQYNSTYRVVSVLTVLHQD
WLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIASKAKGQPREPQVYTLPPCRDKLT
KNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFF
LYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKG
GGGGGGGGGGGGGGDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKP
KDTLMASRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPRE

EQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTI SKAK GQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQ PENNYKTPPVLKSDGSFFLYSDLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEAL HNHYTQKSLSLSPG (SEQ ID NO: 72). Em algumas modalidades, cada um dentre o primeiro polipeptídeo e o segundo polipeptídeo compreende, consiste em, ou consiste essencialmente na sequência SEQ ID NO: 72 com até 10 (por exemplo, até 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 ou 1) modificações de aminoácidos únicos (por exemplo, substituições, por exemplo, substituições conservativas). Em algumas modalidades, cada um dentre o primeiro polipeptídeo e o segundo polipeptídeo compreende, consiste em, ou consiste essencialmente na sequência da SEQ ID NO: 72 com até 10 (por exemplo, não mais que 1, não mais que 2, não mais que 3, não mais que 4, não mais que 5, não mais que 6, não mais que 7, não mais que 8, não mais que 9) modificações de aminoácidos únicos na região fora do peptídeo de ligação (por exemplo, a subsequência GGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGG (SEQ ID NO: 23)). O peptídeo de ligação dentro da SEQ ID NO:72 pode ser substituído por um peptídeo de ligação alternativo. Em algumas modalidades, cada um dentre o primeiro polipeptídeo e o segundo polipeptídeo compreende, consiste em, ou consiste essencialmente na sequência da SEQ ID NO: 72 com até 10 modificações de aminoácidos únicos, contanto que a posição 72 da SEQ ID NO: 72 seja prolina, a posição 134 da SEQ ID NO: 72 seja cistina, a posição 137 da SEQ ID NO: 72 seja lisina, a posição 146 da SEQ ID NO: 72 seja triptofano, a posição 426 da SEQ ID NO: 72 seja lisina e a posição 436 da SEQ ID NO: 72 seja ácido aspártico.

[0036] Em algumas modalidades, cada um dentre o primeiro polipeptídeo e o segundo polipeptídeo compreende, consiste em, ou consiste essencialmente na sequência

DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMASRTPEVTCVVVDVS

HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPPEEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVTLPCCRDKLT
KNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKGGGG
GGGGGGGGGGGGGGGGDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPRE
EQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVTLPSSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQ
PENNYKTTPPVLKSDGSFFLYSDLTVDKSRWQQGNVFSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPG (SEQ ID NO: 74). Em algumas modalidades,
cada um dentre o primeiro polipeptídeo e o segundo polipeptídeo compreende, consiste em, ou consiste essencialmente na sequência
SEQ ID NO: 74 com até 10 (por exemplo, até 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 ou 1) modificações de aminoácidos únicos (por exemplo, substituições, por
exemplo, substituições conservativas). Em algumas modalidades, cada um dentre o primeiro polipeptídeo e o segundo polipeptídeo compreende, consiste em, ou consiste essencialmente na sequência da
SEQ ID NO: 74 com até 10 (por exemplo, não mais que 1, não mais que 2, não mais que 3, não mais que 4, não mais que 5, não mais que
6, não mais que 7, não mais que 8, não mais que 9) modificações de aminoácidos únicos na região fora do peptídeo de ligação (por exemplo, a subsequência GGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGG (SEQ ID NO:
23). O peptídeo de ligação dentro da SEQ ID NO:74 pode ser substituído por um peptídeo de ligação alternativo. Em algumas modalidades, cada um dentre o primeiro polipeptídeo e o segundo polipeptídeo compreende, consiste em, ou consiste essencialmente na sequência
da SEQ ID NO: 74 com até 10 modificações de aminoácidos únicos, contanto que a posição 33 da SEQ ID NO: 74 seja alanina, a posição
72 da SEQ ID NO: 74 seja prolina, a posição 134 da SEQ ID NO: 74 seja cisteína, a posição 137 da SEQ ID NO: 74 seja lisina, a posição

146 da SEQ ID NO: 74 seja triptofano, a posição 426 da SEQ ID NO: 74 seja lisina e a posição 436 da SEQ ID NO: 74 seja ácido aspártico.

[0037] Em algumas modalidades, cada um dentre o primeiro polipeptídeo e o segundo polipeptídeo compreende, consiste em, ou consiste essencialmente na sequência

DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMASRTPEVTCVVVDVS
HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPPEEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPVYTLPPCRDKLT
KNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKG
GGGGGGGGGGGGGGGGDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKP
KDTLMASRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPRE
EQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK
GQPREPVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQ
PENNYKTPVLDGSFFLYSDLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEAL
HNHYTQKSLSLSPG (SEQ ID NO: 75). Em algumas modalidades, cada um dentre o primeiro polipeptídeo e o segundo polipeptídeo compreende, consiste em, ou consiste essencialmente na sequência da SEQ ID NO: 75 com até 10 (por exemplo, até 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 ou 1) modificações de aminoácidos únicos (por exemplo, substituições, por exemplo, substituições conservativas). Em algumas modalidades, cada um dentre o primeiro polipeptídeo e o segundo polipeptídeo compreende, consiste em, ou consiste essencialmente na sequência da SEQ ID NO: 75 com até 10 (por exemplo, não mais que 1, não mais que 2, não mais que 3, não mais que 4, não mais que 5, não mais que 6, não mais que 7, não mais que 8, não mais que 9) modificações de aminoácidos únicos na região fora do peptídeo de ligação (por exemplo, a subsequência GGGGGGGGGGGGGGGGGGG (SEQ ID NO: 23). O peptídeo de ligação dentro da SEQ ID NO:75 pode ser substituído por um peptídeo de ligação alternativo. Em algumas modalidades,

cada um dentre o primeiro polipeptídeo e o segundo polipeptídeo compreende, consiste em, ou consiste essencialmente na sequência da SEQ ID NO: 75 com até 10 modificações de aminoácidos únicos, contanto que a posição 33 da SEQ ID NO: 75 seja alanina, a posição 72 da SEQ ID NO: 75 seja prolina, a posição 134 da SEQ ID NO: 75 seja cisteína, a posição 137 da SEQ ID NO: 75 seja lisina, a posição 146 da SEQ ID NO: 75 seja triptofano, a posição 280 da SEQ ID NO: 75 seja alanina, a posição 426 da SEQ ID NO: 75 seja lisina e a posição 436 da SEQ ID NO: 75 seja ácido aspártico.

[0038] Em algumas modalidades, cada um dentre o primeiro polipeptídeo e o segundo polipeptídeo compreende, consiste em, ou consiste essencialmente na sequência

DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVS
HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPPEEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTI
SKAKGQPREPVYTLPPCRDKLT
KNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFF
LYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKG
GGGGGGGGGGGGGGGGDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKP
KDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTPPE
EQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTI
SKAKGQPREPVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQ
PENNYKTTPPVLKSDGSFFLYSDLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEAL
HNHYTQKSLSLSPG (SEQ ID NO: 76). Em algumas modalidades, cada um dentre o primeiro polipeptídeo e o segundo polipeptídeo compreende, consiste em, ou consiste essencialmente na sequência da SEQ ID NO: 76 com até 10 (por exemplo, até 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 ou 1) modificações de aminoácidos únicos (por exemplo, substituições, por exemplo, substituições conservativas). Em algumas modalidades, cada um dentre o primeiro polipeptídeo e o segundo polipeptídeo compreende, consiste em, ou consiste essencialmente na sequência da

SEQ ID NO: 76 com até 10 (por exemplo, não mais que 1, não mais que 2, não mais que 3, não mais que 4, não mais que 5, não mais que 6, não mais que 7, não mais que 8, não mais que 9) modificações de aminoácidos únicos na região fora do peptídeo de ligação (por exemplo, a subsequência GGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGG (SEQ ID NO: 23). O peptídeo de ligação dentro da SEQ ID NO:76 pode ser substituído por um peptídeo de ligação alternativo. Em algumas modalidades, cada um dentre o primeiro polipeptídeo e o segundo polipeptídeo compreende, consiste em, ou consiste essencialmente na sequência da SEQ ID NO: 76 com até 10 modificações de aminoácidos únicos, contanto que a posição 72 da SEQ ID NO: 76 seja uma prolina e a posição 319 da SEQ ID NO: 76 seja uma prolina. Em algumas modalidades, cada um dentre o primeiro polipeptídeo e o segundo polipeptídeo compreende, consiste em, ou consiste essencialmente na sequência DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVS HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPPEEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPVYTLPPCRDKLT KNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSSFL YSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKGGGGGGGGGGGGGGGGDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMASRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPPEEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLKSDGSFFLYSDLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG (SEQ ID NO: 77). Em algumas modalidades, cada um dentre o primeiro polipeptídeo e o segundo polipeptídeo compreende, consiste em, ou consiste essencialmente na sequência SEQ ID NO: 77 com até 10 (por exemplo, até 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 ou 1) modificações de aminoácidos únicos (por exemplo, substituições, por exemplo, substituições conservativas). Em algumas modalidades, ca-

da um dentre o primeiro polipeptídeo e o segundo polipeptídeo compreende, consiste em, ou consiste essencialmente na sequência da SEQ ID NO: 77 com até 10 (por exemplo, não mais que 1, não mais que 2, não mais que 3, não mais que 4, não mais que 5, não mais que 6, não mais que 7, não mais que 8, não mais que 9) modificações de aminoácidos únicos na região fora do peptídeo de ligação (por exemplo, a subsequência GGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGG (SEQ ID NO: 23). O peptídeo de ligação dentro da SEQ ID NO:77 pode ser substituído por um peptídeo de ligação alternativo. Em algumas modalidades, cada um dentre o primeiro polipeptídeo e o segundo polipeptídeo compreende, consiste em, ou consiste essencialmente na sequência da SEQ ID NO: 77 com até 10 modificações de aminoácidos únicos, contanto que a posição 72 da SEQ ID NO: 77 seja prolina, a posição 134 da SEQ ID NO: 77 seja cisteína, a posição 137 da SEQ ID NO: 77 seja lisina, a posição 146 da SEQ ID NO: 77 seja triptofano, a posição 280 da SEQ ID NO: 77 seja alanina, a posição 319 da SEQ ID NO: 77 seja prolina, a posição 426 da SEQ ID NO: 77 seja lisina e a posição 436 da SEQ ID NO: 77 seja ácido aspártico.

[0039] Em algumas modalidades, cada um dentre o primeiro polipeptídeo e o segundo polipeptídeo compreende, consiste em, ou consiste essencialmente na sequência

DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMASRTPEVTCVVVDVS
HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPPEEQYNSTYRVVSVLTVLHQD
WLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIISKAKGQPREPQVYTLPPCRDKLT
KNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFF
LYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKG
GGGGGGGGGGGGGGGGDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKP
KDTLMASRTPEVTCVVVDVSHEDEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPPE
EQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIISKAK
GQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQ

PENNYKTPPVLKSDGSFFLYSDLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG (SEQ ID NO: 79). Em algumas modalidades, cada um dentre o primeiro polipeptídeo e o segundo polipeptídeo compreende, consiste em, ou consiste essencialmente na sequência SEQ ID NO: 79 com até 10 (por exemplo, até 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 ou 1) modificações de aminoácidos únicos (por exemplo, substituições, por exemplo, substituições conservativas). Em algumas modalidades, cada um dentre o primeiro polipeptídeo e o segundo polipeptídeo compreende, consiste em, ou consiste essencialmente na sequência da SEQ ID NO: 79 com até 10 (por exemplo, não mais que 1, não mais que 2, não mais que 3, não mais que 4, não mais que 5, não mais que 6, não mais que 7, não mais que 8, não mais que 9) modificações de aminoácidos únicos na região fora do peptídeo de ligação (por exemplo, a subsequência GGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGG (SEQ ID NO: 23). O peptídeo de ligação dentro da SEQ ID NO:79 pode ser substituído por um peptídeo de ligação alternativo. Em algumas modalidades, cada um dentre o primeiro polipeptídeo e o segundo polipeptídeo compreende, consiste em, ou consiste essencialmente na sequência da SEQ ID NO: 79 com até 10 modificações de aminoácidos únicos, contanto que a posição 33 da SEQ ID NO: 79 seja alanina, a posição 72 da SEQ ID NO: 79 seja prolina, a posição 280 da SEQ ID NO: 79 seja alanina e a posição 319 da SEQ ID NO: 79 seja prolina.

[0040] Em algumas modalidades, cada um dentre o terceiro polipeptídeo e o quarto polipeptídeo compreende, consiste em, ou consiste essencialmente na sequência

DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMASRTPEVTCVVVDVS
HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPPEEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPVQVCTLPPSRDELT
KNQVSLSCAVDGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFF
LVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG (SEQ

ID NO: 73). Em algumas modalidades, cada um dentre o terceiro polipeptídeo e o quarto polipeptídeo compreende, consiste em, ou consiste essencialmente na sequência SEQ ID NO: 73 com até 10 (por exemplo, até 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 ou 1) modificações de aminoácidos únicos (por exemplo, substituições, por exemplo, substituições conservativas). Em algumas modalidades, cada um dentre o terceiro polipeptídeo e o quarto polipeptídeo compreende, consiste em, ou consiste essencialmente na sequência SEQ ID NO: 73 com até 10 modificações de aminoácidos únicos, contanto que a posição 33 da SEQ ID NO: 73 seja uma alanina e a posição 72 da SEQ ID NO: 73 seja uma prolina.

[0041] Em algumas modalidades, cada um dentre o terceiro polipeptídeo e o quarto polipeptídeo compreende, consiste em, ou consiste essencialmente na sequência

DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVS
HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQD
WLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPPSRDELT
KNQVSLSCAVDGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFF
LVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG (SEQ
ID NO: 61). Em algumas modalidades, cada um dentre o terceiro polipeptídeo e o quarto polipeptídeo compreende, consiste em, ou consiste essencialmente na sequência SEQ ID NO: 61 com até 10 (por exemplo, até 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 ou 1) modificações de aminoácidos únicos (por exemplo, substituições, por exemplo, substituições conservativas). Em algumas modalidades, cada um dentre o terceiro polipeptídeo e o quarto polipeptídeo compreende, consiste em, ou consiste essencialmente na sequência SEQ ID NO: 61 com até 10 modificações de aminoácidos únicos, contanto que a posição 129 da SEQ ID NO: 61 seja cisteína, a posição 146 da SEQ ID NO: 61 seja serina, a posição 148 da SEQ ID NO: 61 seja alanina, a posição 150 da SEQ ID

NO: 61 seja ácido aspártico e a posição 187 da SEQ ID NO: 61 seja valina.

[0042] Em algumas modalidades, cada um dentre o terceiro polipeptídeo e o quarto polipeptídeo compreende, consiste em, ou consiste essencialmente na sequência

DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMASRTPEVTCVVVDVS
HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQD
WLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIISKAKGQPREPQVCTLPPSRDELT
KNQVSLSCAVDGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFF
LVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG (SEQ
ID NO: 63). Em algumas modalidades, cada um dentre o terceiro polipeptídeo e o quarto polipeptídeo compreende, consiste em, ou consiste essencialmente na sequência SEQ ID NO: 63 com até 10 (por exemplo, até 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 ou 1) modificações de aminoácidos únicos (por exemplo, substituições, por exemplo, substituições conservativas). Em algumas modalidades, cada um dentre o terceiro polipeptídeo e o quarto polipeptídeo compreende, consiste em, ou consiste essencialmente na sequência SEQ ID NO: 63 com até 10 modificações de aminoácidos únicos, contanto que a posição 33 da SEQ ID NO: 63 seja alanina.

[0043] Em algumas modalidades, cada um dentre o terceiro polipeptídeo e o quarto polipeptídeo compreende, consiste em, ou consiste essencialmente na sequência

DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVS
HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTPPEEQYNSTYRVVSVLTVLHQD
WLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIISKAKGQPREPQVCTLPPSRDELT
KNQVSLSCAVDGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFF
LVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG (SEQ
ID NO: 70). Em algumas modalidades, cada um dentre o terceiro polipeptídeo e o quarto polipeptídeo compreende, consiste em, ou consis-

te essencialmente na sequência SEQ ID NO: 70 com até 10 (por exemplo, até 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 ou 1) modificações de aminoácidos únicos (por exemplo, substituições, por exemplo, substituições conservativas). Em algumas modalidades, cada um dentre o terceiro polipeptídeo e o quarto polipeptídeo compreende, consiste em, ou consiste essencialmente na sequência SEQ ID NO: 70 com até 10 modificações de aminoácidos únicos, contanto que a posição 72 da SEQ ID NO: 70 seja uma prolina.

[0044] Em algumas modalidades, cada um dentre o primeiro e o segundo polipeptídeo compreende, consiste em, ou consiste essencialmente na sequência

DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMASRTPEVTCVVVDVS
HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPPEEQYNSTYRVVSVLTVLHQD
WLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIISKAKGQPREPVYTLPPCRDKLT
KNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFF
LYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKG
GGGGGGGGGGGGGGGGDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKP
KDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPPE
EQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIISKAK
GQPREPVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQ
PENNYKTPPVLDGSFFLYSDLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEAL
HNHYTQKSLSLSPG (SEQ ID NO: 78) e cada um dentre o terceiro e o quarto polipeptídeo compreende, consiste em, ou consiste essencialmente na sequência

DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMASRTPEVTCVVVDVS
HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPPEEQYNSTYRVVSVLTVLHQD
WLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIISKAKGQPREPVCTLPPSRDELT
KNQVSLSCAVDGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFF
LVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG (SEQ
ID NO: 73). Em algumas modalidades, cada um dentre o primeiro e o

segundo polipeptídeo compreende, consiste em, ou consiste essencialmente na sequência SEQ ID NO: 78 com até 10 (por exemplo, até 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 ou 1) modificações de aminoácidos únicos (por exemplo, substituições, por exemplo, substituições conservativas) e cada um dentre o terceiro e o quarto polipeptídeo compreende, consiste em ou consiste essencialmente na sequência da SEQ ID NO: 73 com até 10 (9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 ou 1) modificações de aminoácidos únicos (por exemplo, substituições, por exemplo, substituições conservativas). Em algumas modalidades, cada um dentre o primeiro e o segundo polipeptídeo compreende, consiste em, ou consiste essencialmente na sequência SEQ ID NO: 78 com até 10 modificações de aminoácidos únicos, contanto que nenhum dos até 10 (por exemplo, não mais do que 1, não mais do que 2, não mais do que 3, não mais do que 4, não mais do que 5, não mais do que 6, não mais do que 7, não mais do que 8, não mais do que 9) modificações de aminoácidos únicos na região fora do peptídeo de ligação (por exemplo, a subsequência GGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGG (SEQ ID NO: 23). O peptídeo de ligação dentro da SEQ ID NO:78 pode ser substituído por um peptídeo de ligação alternativo. Em algumas modalidades, cada um dentre o primeiro e o segundo polipeptídeo compreende, consiste em, ou consiste essencialmente na sequência SEQ ID NO: 78 com até 10 modificações de aminoácidos únicos, contanto que a posição 33 da SEQ ID NO: 78 seja alanina, a posição 72 da SEQ ID NO: 78 seja prolina e a posição 319 da SEQ ID NO: 78 seja prolina, e cada um dentre o terceiro e o quarto polipeptídeo compreende, consiste em, ou consiste essencialmente na sequência SEQ ID NO: 73 com até 10 modificações de aminoácidos únicos, contanto que a posição 33 da SEQ ID NO: 73 seja uma alanina e a posição 72 da SEQ ID NO: 73 seja uma prolina.

[0045] Em algumas modalidades, cada um dentre o primeiro e o

segundo polipeptídeo compreende, consiste em, ou consiste essencialmente na sequência

DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVS
HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPVYTLPPCRDKLT
KNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKG
GGGGGGGGGGGGGGGGDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTPRE
EQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQ
PENNYKTPPVLDSDGSFFLYSDLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG (SEQ ID NO: 49), e cada um dentre o terceiro e o quarto polipeptídeo compreende, consiste em, ou consiste essencialmente na sequência

DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVS
HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPVYTLPPSRDELT
KNQVSLSCAVDGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG (SEQ
ID NO: 61). Em algumas modalidades, cada um dentre o primeiro e o segundo polipeptídeo compreende, consiste em, ou consiste essencialmente na sequência SEQ ID NO: 49 com até 10 (por exemplo, até 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 ou 1) modificações de aminoácidos únicos (por exemplo, substituições, por exemplo, substituições conservativas) e cada um dentre o terceiro e o quarto polipeptídeo compreende, consiste em, ou consiste essencialmente na sequência SEQ ID NO: 61 com até 10 (9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 ou 1) modificações de aminoácidos únicos (por exemplo, substituições, por exemplo, substituições conservativas). Em algumas modalidades, cada um dentre o primeiro e o segundo po-

lipéptídeo compreende, consiste em, ou consiste essencialmente na sequência SEQ ID NO: 49 com até (por exemplo, não mais que 1, não mais que 2, não mais que 3, não mais que 4, não mais que 5, não mais que 6, não mais que 7, não mais que 8, não mais que 9) modificações de aminoácidos únicos na região fora do peptídeo de ligação (por exemplo, a subsequência GGGGGGGGGGGGGGGGGGG (SEQ ID NO: 23); o peptídeo de ligação dentro da SEQ ID NO:76 pode ser substituído por um peptídeo de ligação alternativo) e cada um dentre o terceiro e o quarto polipeptídeo compreende, consiste em, ou consiste essencialmente na sequência SEQ ID NO: 61 com até 10 modificações de aminoácidos únicos. Em algumas modalidades, cada um dentre o primeiro e o segundo polipeptídeo compreende, consiste em, ou consiste essencialmente na sequência SEQ ID NO: 49 com até 10 modificações de aminoácidos únicos, contanto que a posição 134 da SEQ ID NO: 49 seja cisteína, a posição 137 da SEQ ID NO: 49 seja lisina, a posição 146 da SEQ ID NO: 49 seja triptofano, a posição 426 da SEQ ID NO: 49 seja lisina e a posição 436 da SEQ ID NO: 49 seja ácido aspártico; e cada um dentre o terceiro e o quarto polipeptídeo compreende, consiste em, ou consiste essencialmente na sequência SEQ ID NO: 61 com até 10 modificações de aminoácidos únicos, contanto que a posição 129 da SEQ ID NO: 61 seja cisteína, a posição 146 da SEQ ID NO: 61 seja serina, a posição 148 da SEQ ID NO: 61 seja alanina, a posição 150 da SEQ ID NO: 61 seja ácido aspártico e a posição 187 da SEQ ID NO: 61 seja valina.

[0046] Em algumas modalidades, cada um dentre o primeiro e o segundo polipeptídeo compreende, consiste em, ou consiste essencialmente na sequência

DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVS
HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPVYTLPPCRDKLT

KNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFF
LYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKG
GGGGGGGGGGGGGGGGDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKP
KDTLMASRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKP
EQYNSTYRVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTI
GQPREPVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQ
PENNYKTTPPVLKSDGSFFLYSDLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEAL
HNHYTQKSLSLSPG (SEQ ID NO: 62), e cada um dentre o terceiro e
o quarto polipeptídeo compreende, consiste em, ou consiste
essencialmente na sequência

DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPDKTLMISRTPEVTCVVVDVS
HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVSVLTVLHQD
WLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIKAKGQPREPVCTLPPSRDELT
KNQVSLSCAVDGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFF
LVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG (SEQ
ID NO: 61). Em algumas modalidades, cada um dentre o primeiro e o
segundo polipeptídeo compreende, consiste em, ou consiste essencial-
mente na sequência SEQ ID NO: 62 com até 10 (por exemplo, até 9,
8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 ou 1) modificações de aminoácidos únicos (por
exemplo, substituições, por exemplo, substituições conservativas) e
cada um dentre o terceiro e o quarto polipeptídeo compreende, consis-
te em, ou consiste essencialmente na sequência SEQ ID NO: 61 com
até 10 (9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 ou 1) modificações de aminoácidos únicos
(por exemplo, substituições, por exemplo, substituições conservativas).
Em algumas modalidades, cada um dentre o primeiro e o segundo po-
lipetídeo compreende, consiste em, ou consiste essencialmente na
sequência SEQ ID NO: 62 com até 10 (por exemplo, não mais que 1,
não mais que 2, não mais que 3, não mais que 4, não mais que 5, não
mais que 6, não mais que 7, não mais que 8, não mais que 9) modifi-
cações de aminoácidos únicos na região fora do peptídeo de ligação

(por exemplo, a subsequência GGGGGGGGGGGGGGGGGGG (SEQ ID NO: 23); o peptídeo de ligação dentro da SEQ ID NO:62 pode ser substituído por um peptídeo de ligação alternativo) e cada um dentre o terceiro e o quarto polipeptídeo compreende, consiste em, ou consiste essencialmente na sequência SEQ ID NO: 61 com até 10 modificações de aminoácidos únicos. Em algumas modalidades, cada um dentre o primeiro e o segundo polipeptídeo compreende, consiste em, ou consiste essencialmente na sequência SEQ ID NO: 62 com até 10 modificações de aminoácidos únicos, contanto que a posição 134 da SEQ ID NO: 62 seja cisteína, a posição 137 da SEQ ID NO: 62 seja lisina, a posição 146 da SEQ ID NO: 62 seja triptofano, a posição 280 da SEQ ID NO: 62 seja alanina, a posição 426 da SEQ ID NO: 62 seja lisina e a posição 436 da SEQ ID NO: 62 seja ácido aspártico; e cada um dentre o terceiro e o quarto polipeptídeo compreende, consiste em, ou consiste essencialmente na sequência SEQ ID NO: 61 com até 10 modificações de aminoácidos únicos, contanto que a posição 129 da SEQ ID NO: 61 seja cisteína, a posição 146 da SEQ ID NO: 61 seja serina, a posição 148 da SEQ ID NO: 61 seja alanina, a posição 150 da SEQ ID NO: 61 seja ácido aspártico e a posição 187 da SEQ ID NO: 61 seja valina.

[0047] Em algumas modalidades, cada um dentre o primeiro e o segundo polipeptídeo compreende, consiste em, ou consiste essencialmente na sequência

DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMASRTPEVTCVVVDVS
HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCRDKLT
KNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFF
LYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKG
GGGGGGGGGGGGGGGGDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKP
KDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDEVKFNWYVDGVEVHNAKTKP
RE

EQYNSTYRVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTI SKAK GQPREPQVYTLPPSRDELT K N Q V S L T C L V K G F Y P S D I A V E W E S N G Q PENNYKTPPVLKSDGSFFLYSDLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEAL HNHYTQKSLSLSPG (SEQ ID NO: 64), e cada um dentre o terceiro e o quarto polipeptídeo compreende, consiste em, ou consiste essencialmente na sequência

DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMASRTPEVTCVVVDVS HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVSVLTVLHQD WLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTI SKAK G Q P R E P Q V C T L P P S R D E L T K N Q V S L S C A V D G F Y P S D I A V E W E S N G Q P E N N Y K T P P V L D S D G S F F L V S K L T V D K S R W Q Q G N V F S C S V M H E A L H N H Y T Q K S L S L S P G (SEQ ID NO: 63). Em algumas modalidades, cada um dentre o primeiro e o segundo polipeptídeo compreende, consiste em, ou consiste essencialmente na sequência SEQ ID NO: 64 com até 10 (por exemplo, até 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 ou 1) modificações de aminoácidos únicos (por exemplo, substituições, por exemplo, substituições conservativas) e cada um dentre o terceiro e o quarto polipeptídeo compreende, consiste em, ou consiste essencialmente na sequência SEQ ID NO: 63 com até 10 (9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 ou 1) modificações de aminoácidos únicos (por exemplo, substituições, por exemplo, substituições conservativas). Em algumas modalidades, cada um dentre o primeiro e o segundo polipeptídeo compreende, consiste em, ou consiste essencialmente na sequência SEQ ID NO: 64 com até 10 (por exemplo, não mais que 1, não mais que 2, não mais que 3, não mais que 4, não mais que 5, não mais que 6, não mais que 7, não mais que 8, não mais que 9) modificações de aminoácidos únicos na região fora do peptídeo de ligação (por exemplo, a subsequência GGGGGGGGGGGGGGGGGGG (SEQ ID NO: 23); o peptídeo de ligação dentro da SEQ ID NO: 64 pode ser substituído por um peptídeo de ligação alternativo) e cada um dentre o terceiro e o quarto polipeptídeo compreende, consiste em, ou consiste

essencialmente na sequência SEQ ID NO: 63 com até 10 modificações de aminoácidos únicos. Em algumas modalidades, cada um dentre o primeiro e o segundo polipeptídeo compreende, consiste em, ou consiste essencialmente na sequência SEQ ID NO: 64 com até 10 modificações de aminoácidos únicos, contanto que a posição 33 da SEQ ID NO: 64 seja alanina, e cada um dentre o terceiro e o quarto polipeptídeo compreende, consiste em, ou consiste essencialmente na sequência SEQ ID NO: 63 com até 10 modificações de aminoácidos únicos, contanto que a posição 33 da SEQ ID NO: 63 seja alanina.

[0048] Em algumas modalidades, cada um dentre o primeiro e o segundo polipeptídeo compreende, consiste em, ou consiste essencialmente na sequência

DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMASRTPEVTCVVVDVS
HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTI
SKAKGQPREPVYTLPPCRDKLT
KNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFF
LYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKG
GGGGGGGGGGGGGGGGDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKP
KDTLMASRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKP
REEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTI
SKAKGQPREPVYTLPPSRDELT
KNQVSLCAVDGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFF
LVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG (SEQ ID NO: 65), e cada um dentre o terceiro e o quarto polipeptídeo compreende, consiste em, ou consiste essencialmente na sequência

DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMASRTPEVTCVVVDVS
HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTI
SKAKGQPREPVYTLPPSRDELT
KNQVSLCAVDGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFF
LVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG (SEQ

ID NO: 63). Em algumas modalidades, cada um dentre o primeiro e o segundo polipeptídeo compreende, consiste em, ou consiste essencialmente na sequência SEQ ID NO: 65 com até 10 (por exemplo, até 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 ou 1) modificações de aminoácidos únicos (por exemplo, substituições, por exemplo, substituições conservativas) e cada um dentre o terceiro e o quarto polipeptídeo compreende, consiste em, ou consiste essencialmente na sequência SEQ ID NO: 63 com até 10 (9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 ou 1) modificações de aminoácidos únicos (por exemplo, substituições, por exemplo, substituições conservativas). Em algumas modalidades, cada um dentre o primeiro e o segundo polipeptídeo compreende, consiste em, ou consiste essencialmente na sequência SEQ ID NO: 65 com até 10 (por exemplo, não mais que 1, não mais que 2, não mais que 3, não mais que 4, não mais que 5, não mais que 6, não mais que 7, não mais que 8, não mais que 9) modificações de aminoácidos únicos na região fora do peptídeo de ligação (por exemplo, a subsequência GGGGGGGGGGGGGGGGGGG (SEQ ID NO: 23); o peptídeo de ligação dentro da SEQ ID NO:65 pode ser substituído por um peptídeo de ligação alternativo) e cada um dentre o terceiro e o quarto polipeptídeo compreende, consiste em, ou consiste essencialmente na sequência SEQ ID NO: 63 com até 10 modificações de aminoácidos únicos. Em algumas modalidades, cada um dentre o primeiro e o segundo polipeptídeo compreende, consiste em, ou consiste essencialmente na sequência SEQ ID NO: 65 com até 10 modificações de aminoácidos únicos, contanto que a posição 33 da SEQ ID NO: 65 seja alanina, a posição 134 da SEQ ID NO: 65 seja cisteína, a posição 137 da SEQ ID NO: 65 seja lisina, a posição 146 da SEQ ID NO: 65 seja triptofano, a posição 280 da SEQ ID NO: 65 seja alanina, a posição 426 da SEQ ID NO: 65 seja lisina e a posição 436 da SEQ ID NO: 65 seja ácido aspártico, e cada um dentre o terceiro e o quarto polipeptídeo compreende, consiste em, ou consiste essencialmente na sequência SEQ ID NO: 63 com até 10 modificações de aminoácidos únicos.

almente na sequência SEQ ID NO: 63 com até 10 modificações de aminoácidos únicos, contanto que a posição 33 da SEQ ID NO: 63 seja alanina.

[0049] Em algumas modalidades, cada um dentre o primeiro e o segundo polipeptídeo compreende, consiste em, ou consiste essencialmente na sequência

DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVS
HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPVYTLPPCRDKLT
KNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKG
GGGGGGGGGGGGGGGGDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTPPE
EQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPVYTLPPSRDELT
KNQVSLCAVDGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG (SEQ ID NO: 66), e cada um dentre o terceiro e o quarto polipeptídeo compreende, consiste em, ou consiste essencialmente na sequência

DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVS
HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPVYTLPPSRDELT
KNQVSLCAVDGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG (SEQ ID NO: 61). Em algumas modalidades, cada um dentre o primeiro e o segundo polipeptídeo compreende, consiste em, ou consiste essencialmente na sequência SEQ ID NO: 66 com até 10 (por exemplo, até 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 ou 1) modificações de aminoácidos únicos (por exemplo, substituições, por exemplo, substituições conservativas) e cada um dentre o terceiro e o quarto polipeptídeo compreende, consis-

te em, ou consiste essencialmente na sequência SEQ ID NO: 61 com até 10 (9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 ou 1) modificações de aminoácidos únicos (por exemplo, substituições, por exemplo, substituições conservativas). Em algumas modalidades, cada um dentre o primeiro e o segundo polipeptídeo compreende, consiste em, ou consiste essencialmente na sequência SEQ ID NO: 66 com até 10 (por exemplo, não mais que 1, não mais que 2, não mais que 3, não mais que 4, não mais que 5, não mais que 6, não mais que 7, não mais que 8, não mais que 9) modificações de aminoácidos únicos na região fora do peptídeo de ligação (por exemplo, a subsequência GGGGGGGGGGGGGGGGGGG (SEQ ID NO: 23); o peptídeo de ligação dentro da SEQ ID NO:66 pode ser substituído por um peptídeo de ligação alternativo) e cada um dentre o terceiro e o quarto polipeptídeo compreende, consiste em, ou consiste essencialmente na sequência SEQ ID NO: 61 com até 10 modificações de aminoácidos únicos. Em algumas modalidades, cada um dentre o primeiro e o segundo polipeptídeo compreende, consiste em, ou consiste essencialmente na sequência SEQ ID NO: 66 com até 10 modificações de aminoácidos únicos, contanto que a posição 134 da SEQ ID NO: 66 seja cisteína, a posição 137 da SEQ ID NO: 66 seja lisina, a posição 146 da SEQ ID NO: 66 seja triptofano, a posição 319 da SEQ ID NO: 66 seja prolina, a posição 426 da SEQ ID NO: 66 seja lisina e a posição 436 da SEQ ID NO: 66 seja ácido aspártico, e cada um dentre o terceiro e o quarto polipeptídeo compreende, consiste em, ou consiste essencialmente na sequência SEQ ID NO: 61 com até 10 modificações de aminoácidos únicos, contanto que a posição 129 da SEQ ID NO: 61 seja cisteína, a posição 146 da SEQ ID NO: 61 seja serina, a posição 148 da SEQ ID NO: 61 seja alanina, a posição 150 da SEQ ID NO: 61 seja ácido aspártico e a posição 187 da SEQ ID NO: 61 seja valina.

[0050] Em algumas modalidades, cada um dentre o primeiro e o

segundo polipeptídeo compreende, consiste em, ou consiste essencialmente na sequência

DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVS
HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPVYTLPPCRDKLT
KNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFF
LYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKG
GGGGGGGGGGGGGGGGDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPK
KDTLMASRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTPPE
EQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK
GQPREPVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQ
PENNYKTPPVLDSDGSFFLYSDLTVKSRWQQGNVFSCSVMHEAL
HNHYTQKSLSLSPG (SEQ ID NO: 67), e cada um dentre o terceiro e
o quarto polipeptídeo compreende, consiste em, ou consiste essencialmente na sequência

DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVS
HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPVYTLPPSRDELT
KNQVSLSCAVDGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFF
LVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG (SEQ
ID NO: 61). Em algumas modalidades, cada um dentre o primeiro e o
segundo polipeptídeo compreende, consiste em, ou consiste essencialmente na sequência SEQ ID NO: 67 com até 10 (por exemplo, até 9,
8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 ou 1) modificações de aminoácidos únicos (por
exemplo, substituições, por exemplo, substituições conservativas) e
cada um dentre o terceiro e o quarto polipeptídeo compreende, consiste em, ou consiste essencialmente na sequência SEQ ID NO: 61 com
até 10 (9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 ou 1) modificações de aminoácidos únicos
(por exemplo, substituições, por exemplo, substituições conservativas).
Em algumas modalidades, cada um dentre o primeiro e o segundo po-

lipopeptídeo compreende, consiste em, ou consiste essencialmente na sequência SEQ ID NO: 67 com até 10 (por exemplo, não mais que 1, não mais que 2, não mais que 3, não mais que 4, não mais que 5, não mais que 6, não mais que 7, não mais que 8, não mais que 9) modificações de aminoácidos únicos na região fora do peptídeo de ligação (por exemplo, a subsequência GGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGG (SEQ ID NO: 23; o peptídeo de ligação dentro da SEQ ID NO:67 pode ser substituído por um peptídeo de ligação alternativo), e cada um dentre o terceiro e o quarto polipeptídeo compreende, consiste em, ou consiste essencialmente na sequência SEQ ID NO: 61 com até 10 modificações de aminoácidos únicos. Em algumas modalidades, cada um dentre o primeiro e o segundo polipeptídeo compreende, consiste em, ou consiste essencialmente na sequência SEQ ID NO: 67 com até 10 modificações de aminoácidos únicos, contanto que a posição 134 da SEQ ID NO: 67 seja cisteína, a posição 137 da SEQ ID NO: 67 seja lisina, a posição 146 da SEQ ID NO: 67 seja triptofano, a posição 280 da SEQ ID NO: 67 seja alanina, a posição 318 da SEQ ID NO: 67 seja prolina, a posição 426 da SEQ ID NO: 67 seja lisina e a posição 436 da SEQ ID NO: 67 seja ácido aspártico, e cada um dentre o terceiro e o quarto polipeptídeo compreende, consiste em, ou consiste essencialmente na sequência SEQ ID NO: 61 com até 10 modificações de aminoácidos únicos, contanto que a posição 129 da SEQ ID NO: 61 seja cisteína, a posição 146 da SEQ ID NO: 61 seja serina, a posição 148 da SEQ ID NO: 61 seja alanina, a posição 150 da SEQ ID NO: 61 seja ácido aspártico e a posição 187 da SEQ ID NO: 61 seja valina.

[0051] Em algumas modalidades, cada um dentre o primeiro e o segundo polipeptídeo compreende, consiste em, ou consiste essencialmente na sequência

DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMASRTPEVTCVVVDVS
HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQD

WLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIISKAKGQPQREPQVYTLPPCRDKLT
KNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFF
LYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKG
GGGGGGGGGGGGGGGGDKTHTCPCPAPELLGGPSVFLFPPKP
KDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDEPKFNWYVDGVEVHNAKTKPPE
EQYNSTYRVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIISKAK
GQPQREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQ
PENNYKTPPVLDGSFFLYSDLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEAL
HNHYTQKSLSLSPG (SEQ ID NO: 68), e cada um dentre o terceiro e
o quarto polipeptídeo compreende, consiste em, ou consiste
essencialmente na sequência
DKTHTCPCPAPELLGGPSVFLFPPKP KDTLMISRTPEVTCVVVDVS
HEDPEVFKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVSVLTVLHQD
WLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIISKAKGQPQREPQVCTLPPSRDEL
KNQVSLSCAVDGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFF
LVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG (SEQ
ID NO: 63). Em algumas modalidades, cada um dentre o primeiro e o
segundo polipeptídeo compreende, consiste em, ou consiste essencial-
mente na sequência SEQ ID NO: 68 com até 10 (por exemplo, até 9,
8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 ou 1) modificações de aminoácidos únicos (por
exemplo, substituições, por exemplo, substituições conservativas) e
cada um dentre o terceiro e o quarto polipeptídeo compreende, consis-
te em, ou consiste essencialmente na sequência SEQ ID NO: 63 com
até 10 (9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 ou 1) modificações de aminoácidos únicos
(por exemplo, substituições, por exemplo, substituições conservativas).
Em algumas modalidades, cada um dentre o primeiro e o segundo po-
lipetídeo compreende, consiste em, ou consiste essencialmente na
sequência SEQ ID NO: 68 com até 10 (por exemplo, não mais que 1,
não mais que 2, não mais que 3, não mais que 4, não mais que 5, não
mais que 6, não mais que 7, não mais que 8, não mais que 9) modifi-

cações de aminoácidos únicos na região fora do peptídeo de ligação (por exemplo, a subsequência GGGGGGGGGGGGGGGGG (SEQ ID NO: 23); o peptídeo de ligação dentro da SEQ ID NO:68 pode ser substituído por um peptídeo de ligação alternativo), e cada um dentre o terceiro e o quarto polipeptídeo compreende, consiste em, ou consiste essencialmente na sequência SEQ ID NO: 63 com até 10 modificações de aminoácidos únicos. Em algumas modalidades, cada um dentre o primeiro e o segundo polipeptídeo compreende, consiste em, ou consiste essencialmente na sequência SEQ ID NO: 68 com até 10 modificações de aminoácidos únicos, contanto que a posição 33 da SEQ ID NO: 68 seja alanina, a posição 134 da SEQ ID NO: 68 seja cisteína, a posição 137 da SEQ ID NO: 68 seja lisina, a posição 146 da SEQ ID NO: 68 seja triptofano, a posição 319 da SEQ ID NO: 68 seja prolina, a posição 426 da SEQ ID NO: 68 seja lisina e a posição 436 da SEQ ID NO: 68 seja ácido aspártico, e cada um dentre o terceiro e o quarto polipeptídeo compreende, consiste em, ou consiste essencialmente na sequência SEQ ID NO: 63 com até 10 modificações de aminoácidos únicos, contanto que a posição 33 da SEQ ID NO: 63 seja alanina.

[0052] Em algumas modalidades, cada um dentre o primeiro e o segundo polipeptídeo compreende, consiste em, ou consiste essencialmente na sequência

DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMASRTPEVTCVVVDVS
HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQD
WLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIISKAKGQPREPQVYTLPPCRDKLT
KNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFF
LYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKG
GGGGGGGGGGGGGGGGDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKP
KDTLMASRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPPE
EQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIISKAK

GQPREPVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQ PENNYKTPPVLKSDGSFFLYSDLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEAL HNHYTQKSLSLSPG (SEQ ID NO: 69), e cada um dentre o terceiro e o quarto polipeptídeo compreende, consiste em, ou consiste essencialmente na sequência

DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMASRTPEVTCVVVDVS HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQD WLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIISKAKGQPREPVQLPPSRDELT KNQVSLSCAVDGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFF LVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG (SEQ ID NO: 63). Em algumas modalidades, cada um dentre o primeiro e o segundo polipeptídeo compreende, consiste em, ou consiste essencialmente na sequência SEQ ID NO: 69 com até 10 (por exemplo, até 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 ou 1) modificações de aminoácidos únicos (por exemplo, substituições, por exemplo, substituições conservativas) e cada um dentre o terceiro e o quarto polipeptídeo compreende, consiste em, ou consiste essencialmente na sequência SEQ ID NO: 63 com até 10 (9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 ou 1) modificações de aminoácidos únicos (por exemplo, substituições, por exemplo, substituições conservativas). Em algumas modalidades, cada um dentre o primeiro e o segundo polipeptídeo compreende, consiste em, ou consiste essencialmente na sequência SEQ ID NO: 69 com até 10 (por exemplo, não mais que 1, não mais que 2, não mais que 3, não mais que 4, não mais que 5, não mais que 6, não mais que 7, não mais que 8, não mais que 9) modificações de aminoácidos únicos na região fora do peptídeo de ligação (por exemplo, a subsequência GGGGGGGGGGGGGGGGG (SEQ ID NO: 23); o peptídeo de ligação dentro da SEQ ID NO:69 pode ser substituído por um peptídeo de ligação alternativo), e cada um dentre o terceiro e o quarto polipeptídeo compreende, consiste em, ou consiste essencialmente na sequência SEQ ID NO: 63 com até 10 modifica-

ções de aminoácidos únicos. Em algumas modalidades, cada um dentre o primeiro e o segundo polipeptídeo compreende, consiste em, ou consiste essencialmente na sequência SEQ ID NO: 69 com até 10 modificações de aminoácidos únicos, contanto que a posição 33 da SEQ ID NO: 69 seja alanina, a posição 134 da SEQ ID NO: 69 seja cisteína, a posição 137 da SEQ ID NO: 69 seja lisina, a posição 146 da SEQ ID NO: 69 seja triptofano, a posição 280 da SEQ ID NO: 69 seja alanina, a posição 319 da SEQ ID NO: 69 seja prolina, a posição 426 da SEQ ID NO: 69 seja lisina e a posição 436 da SEQ ID NO: 69 seja ácido aspártico, e cada um dentre o terceiro e o quarto polipeptídeo compreende, consiste em, ou consiste essencialmente na sequência SEQ ID NO: 63 com até 10 modificações de aminoácidos únicos, contanto que a posição 33 da SEQ ID NO: 63 seja alanina.

[0053] Em algumas modalidades, cada um dentre o primeiro e o segundo polipeptídeo compreende, consiste em, ou consiste essencialmente na sequência

DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVS
HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPPEEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPVYTLPPCRDKLT
KNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKG
GGGGGGGGGGGGGGGGDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKP
REEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE
WESNGQPENNYKTTPPVLKSDGSFFLYSDLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG (SEQ ID NO: 71), e cada um dentre o terceiro e o quarto polipeptídeo compreende, consiste em, ou consiste essencialmente na sequência

DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVS

HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPPEEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPPSRDELTKNQVSLSCAVDGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG (SEQ ID NO: 70). Em algumas modalidades, cada um dentre o primeiro e o segundo polipeptídeo compreende, consiste em, ou consiste essencialmente na sequência SEQ ID NO: 71 com até 10 (por exemplo, até 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 ou 1) modificações de aminoácidos únicos (por exemplo, substituições, por exemplo, substituições conservativas) e cada um dentre o terceiro e o quarto polipeptídeo compreende, consiste em, ou consiste essencialmente na sequência SEQ ID NO: 70 com até 10 (9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 ou 1) modificações de aminoácidos únicos (por exemplo, substituições, por exemplo, substituições conservativas). Em algumas modalidades, cada um dentre o primeiro e o segundo polipeptídeo compreende, consiste em, ou consiste essencialmente na sequência SEQ ID NO: 71 com até 10 (por exemplo, não mais que 1, não mais que 2, não mais que 3, não mais que 4, não mais que 5, não mais que 6, não mais que 7, não mais que 8, não mais que 9) modificações de aminoácidos únicos na região fora do peptídeo de ligação (por exemplo, a subsequência GGGGGGGGGGGGGGGGGGG (SEQ ID NO: 23); o peptídeo de ligação dentro da SEQ ID NO:71 pode ser substituído por um peptídeo de ligação alternativo), e cada um dentre o terceiro e o quarto polipeptídeo compreende, consiste em, ou consiste essencialmente na sequência SEQ ID NO: 70 com até 10 modificações de aminoácidos únicos. Em algumas modalidades, cada um dentre o primeiro e o segundo polipeptídeo compreende, consiste em, ou consiste essencialmente na sequência SEQ ID NO: 71 com até 10 modificações de aminoácidos únicos, contanto que a posição 71 da SEQ ID NO: 71 seja prolina, a posição 134 da SEQ ID NO: 71 seja cisteína, a posição 137 da SEQ ID NO: 71 seja lisina, a posição 146 da

SEQ ID NO: 71 seja triptofano, a posição 426 da SEQ ID NO: 71 seja lisina e a posição 436 da SEQ ID NO: 71 seja ácido aspártico, e cada um dentre o terceiro e o quarto polipeptídeo compreende, consiste em, ou consiste essencialmente na sequência SEQ ID NO: 70 com até 10 modificações de aminoácidos únicos, contanto que a posição 72 da SEQ ID NO: 70 seja uma prolina.

[0054] Em algumas modalidades, cada um dentre o primeiro e o segundo polipeptídeo compreende, consiste em, ou consiste essencialmente na sequência

DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVS
HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPPEEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPVYTLPPCRDKLT
KNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKG
GGGGGGGGGGGGGGGGDKHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMASRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKP
REEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE
WESNGQPENNYKTTPPVLKSDGSFFLYSDLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG (SEQ ID NO: 72), e cada um dentre o terceiro e o quarto polipeptídeo compreende, consiste em, ou consiste essencialmente na sequência

DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVS
HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPPEEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPVCTLPPSRDELT
KNQVSLSCAVDGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLVS
KLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG (SEQ ID NO: 70). Em algumas modalidades, cada um dentre o primeiro e o segundo polipeptídeo compreende, consiste em, ou consiste essencialmente na sequência SEQ ID NO: 72 com até 10 (por exemplo, até 9,

8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 ou 1) modificações de aminoácidos únicos (por exemplo, substituições, por exemplo, substituições conservativas) e cada um dentre o terceiro e o quarto polipeptídeo compreende, consiste em, ou consiste essencialmente na sequência SEQ ID NO: 70 com até 10 (9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 ou 1) modificações de aminoácidos únicos (por exemplo, substituições, por exemplo, substituições conservativas). Em algumas modalidades, cada um dentre o primeiro e o segundo polipeptídeo compreende, consiste em, ou consiste essencialmente na sequência SEQ ID NO: 72 com até 10 (por exemplo, não mais que 1, não mais que 2, não mais que 3, não mais que 4, não mais que 5, não mais que 6, não mais que 7, não mais que 8, não mais que 9) modificações de aminoácidos únicos na região fora do peptídeo de ligação (por exemplo, a subsequência GGGGGGGGGGGGGGGGG (SEQ ID NO: 23); o peptídeo de ligação dentro da SEQ ID NO:72 pode ser substituído por um peptídeo de ligação alternativo), e cada um dentre o terceiro e o quarto polipeptídeo compreende, consiste em, ou consiste essencialmente na sequência SEQ ID NO: 70 com até 10 modificações de aminoácidos únicos. Em algumas modalidades, cada um dentre o primeiro e o segundo polipeptídeo compreende, consiste em, ou consiste essencialmente na sequência SEQ ID NO: 72 com até 10 modificações de aminoácidos únicos, contanto que a posição 72 da SEQ ID NO: 72 seja prolina, a posição 134 da SEQ ID NO: 72 seja cistina, a posição 137 da SEQ ID NO: 72 seja lisina, a posição 146 da SEQ ID NO: 72 seja triptofano, a posição 426 da SEQ ID NO: 72 seja lisina e a posição 436 da SEQ ID NO: 72 seja ácido aspártico, e cada um dentre o terceiro e o quarto polipeptídeo compreende, consiste em, ou consiste essencialmente na sequência SEQ ID NO: 70 com até 10 modificações de aminoácidos únicos, e cada um dentre o terceiro e o quarto polipeptídeo compreende, consiste em, ou consiste essencialmente na sequência SEQ ID NO: 70 com até 10 modificações de ami-

noácidos únicos, contanto que a posição 72 da SEQ ID NO: 70 seja uma prolina.

[0055] Em algumas modalidades, cada um dentre o primeiro e o segundo polipeptídeo compreende, consiste em, ou consiste essencialmente na sequência

DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMASRTPEVTCVVVDVS
HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPPEEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPVYTLPPCRDKLT
KNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKG
GGGGGGGGGGGGGGGGDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKP
KDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPRE
EQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK
GQPREPVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQ
PENNYKTPVLDSDGSFFLYSDLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEAL
HNHYTQKSLSLSPG (SEQ ID NO: 74), e cada um dentre o terceiro e o quarto polipeptídeo compreende, consiste em, ou consiste essencialmente na sequência

DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMASRTPEVTCVVVDVS
HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPPEEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPVYTLPPSRDELT
KNQVSLSCAVDGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPVLDSDGSFF
LVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG (SEQ
ID NO: 73). Em algumas modalidades, cada um dentre o primeiro e o segundo polipeptídeo compreende, consiste em, ou consiste essencialmente na sequência SEQ ID NO: 74 com até 10 (por exemplo, até 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 ou 1) modificações de aminoácidos únicos (por exemplo, substituições, por exemplo, substituições conservativas) e cada um dentre o terceiro e o quarto polipeptídeo compreende, consiste em, ou consiste essencialmente na sequência SEQ ID NO: 73 com

até 10 (9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 ou 1) modificações de aminoácidos únicos (por exemplo, substituições, por exemplo, substituições conservativas). Em algumas modalidades, cada um dentre o primeiro e o segundo polipeptídeo compreende, consiste em, ou consiste essencialmente na sequência SEQ ID NO: 74 com até 10 (por exemplo, não mais que 1, não mais que 2, não mais que 3, não mais que 4, não mais que 5, não mais que 6, não mais que 7, não mais que 8, não mais que 9) modificações de aminoácidos únicos na região fora do peptídeo de ligação (por exemplo, a subsequência GGGGGGGGGGGGGGGGGGG (SEQ ID NO: 23); o peptídeo de ligação dentro da SEQ ID NO:74 pode ser substituído por um peptídeo de ligação alternativo), e cada um dentre o terceiro e o quarto polipeptídeo compreende, consiste em, ou consiste essencialmente na sequência SEQ ID NO: 73 com até 10 modificações de aminoácidos únicos. Em algumas modalidades, cada um dentre o primeiro e o segundo polipeptídeo compreende, consiste em, ou consiste essencialmente na sequência SEQ ID NO: 74 com até 10 modificações de aminoácidos únicos, contanto que a posição 33 da SEQ ID NO: 74 seja alanina, a posição 72 da SEQ ID NO: 74 seja prolina, a posição 134 da SEQ ID NO: 74 seja cisteína, a posição 137 da SEQ ID NO: 74 seja lisina, a posição 146 da SEQ ID NO: 74 seja triptofano, a posição 426 da SEQ ID NO: 74 seja lisina e a posição 436 da SEQ ID NO: 74 seja ácido aspártico, e cada um dentre o terceiro e o quarto polipeptídeo compreende, consiste em, ou consiste essencialmente na sequência SEQ ID NO: 73 com até 10 modificações de aminoácidos únicos, contanto que a posição 33 da SEQ ID NO: 73 seja uma alanina e a posição 72 da SEQ ID NO: 73 seja uma prolina.

[0056] Em algumas modalidades, cada um dentre o primeiro e o segundo polipeptídeo compreende, consiste em, ou consiste essencialmente na sequência

DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMASRTPEVTCVVVDVS

HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPPEEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVTLPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKG
GGGGGGGGGGGGGGGGDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMASRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREDQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK
GQPREPQVTLPSSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPVLDSDGSFFLYSDLTVKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG (SEQ ID NO: 75), e cada um dentre o terceiro e o quarto polipeptídeo compreende, consiste em, ou consiste essencialmente na sequência

DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMASRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPPEEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPSSRDELT
KNQVSLSCAVDGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPVLDSDGSFFLYSDLTVKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG (SEQ ID NO: 73). Em algumas modalidades, cada um dentre o primeiro e o segundo polipeptídeo compreende, consiste em, ou consiste essencialmente na sequência SEQ ID NO: 75 com até 10 (por exemplo, até 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 ou 1) modificações de aminoácidos únicos (por exemplo, substituições, por exemplo, substituições conservativas) e cada um dentre o terceiro e o quarto polipeptídeo compreende, consiste em, ou consiste essencialmente na sequência SEQ ID NO: 73 com até 10 (9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 ou 1) modificações de aminoácidos únicos (por exemplo, substituições, por exemplo, substituições conservativas). Em algumas modalidades, cada um dentre o primeiro e o segundo polipeptídeo compreende, consiste em, ou consiste essencialmente na sequência SEQ ID NO: 75 com até 10 (por exemplo, não mais que 1, não mais que 2, não mais que 3, não mais que 4, não mais que 5, não

mais que 6, não mais que 7, não mais que 8, não mais que 9) modificações de aminoácidos únicos na região fora do peptídeo de ligação (por exemplo, a subsequência GGGGGGGGGGGGGGGGG (SEQ ID NO: 23); o peptídeo de ligação dentro da SEQ ID NO:75 pode ser substituído por um peptídeo de ligação alternativo), e cada um dentre o terceiro e o quarto polipeptídeo compreende, consiste em, ou consiste essencialmente na sequência SEQ ID NO: 73 com até 10 modificações de aminoácidos únicos. Em algumas modalidades, cada um dentre o primeiro e o segundo polipeptídeo compreende, consiste em, ou consiste essencialmente na sequência SEQ ID NO: 75 com até 10 modificações de aminoácidos únicos, contanto que a posição 33 da SEQ ID NO: 75 seja alanina, a posição 72 da SEQ ID NO: 75 seja prolína, a posição 134 da SEQ ID NO: 75 seja cisteína, a posição 137 da SEQ ID NO: 75 seja lisina, a posição 146 da SEQ ID NO: 75 seja triptofano, a posição 280 da SEQ ID NO: 75 seja alanina, a posição 426 da SEQ ID NO: 75 seja lisina e a posição 436 da SEQ ID NO: 75 seja ácido aspártico, e cada um dentre o terceiro e o quarto polipeptídeo compreende, consiste em, ou consiste essencialmente na sequência SEQ ID NO: 73 com até 10 modificações de aminoácidos únicos, contanto que a posição 33 da SEQ ID NO: 73 seja uma alanina e a posição 72 da SEQ ID NO: 73 seja uma prolína.

[0057] Em algumas modalidades, cada um dentre o primeiro e o segundo polipeptídeo compreende, consiste em, ou consiste essencialmente na sequência

DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVS
HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPPEEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPVYTLPPCRDKLT
KNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFF
LYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKG
GGGGGGGGGGGGGGGGDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPK

KDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPPE
EQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIKAK
GQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQ
PENNYKTPPVLKSDGSFFLYSDLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEAL
HNHYTQKSLSLSPG (SEQ ID NO: 76), e cada um dentre o terceiro e
o quarto polipeptídeo compreende, consiste em, ou consiste
essencialmente na sequência

DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVS
HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPPEEQYNSTYRVVSVLTVLHQD
WLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIKAKGQPREPQVCTLPPSRDELT
KNQVSLSCAVDGFYPSDIAVEWESNGQ PENNYKTPPVLDSDGSFF
LVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG (SEQ
ID NO: 70). Em algumas modalidades, cada um dentre o primeiro e o
segundo polipeptídeo compreende, consiste em, ou consiste essencial-
mente na sequência SEQ ID NO: 76 com até 10 (por exemplo, até 9,
8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 ou 1) modificações de aminoácidos únicos (por
exemplo, substituições, por exemplo, substituições conservativas) e
cada um dentre o terceiro e o quarto polipeptídeo compreende, consis-
te em, ou consiste essencialmente na sequência SEQ ID NO: 70 com
até 10 (9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 ou 1) modificações de aminoácidos únicos
(por exemplo, substituições, por exemplo, substituições conservativas).
Em algumas modalidades, cada um dentre o primeiro e o segundo po-
lipetídeo compreende, consiste em, ou consiste essencialmente na
sequência SEQ ID NO: 76 com até 10 (por exemplo, não mais que 1,
não mais que 2, não mais que 3, não mais que 4, não mais que 5, não
mais que 6, não mais que 7, não mais que 8, não mais que 9) modifi-
cações de aminoácidos únicos na região fora do peptídeo de ligação
(por exemplo, a subsequência GGGGGGGGGGGGGGGGG (SEQ
ID NO: 23); o peptídeo de ligação dentro da SEQ ID NO:76 pode ser
substituído por um peptídeo de ligação alternativo), e cada um dentre

o terceiro e o quarto polipeptídeo compreende, consiste em, ou consiste essencialmente na sequência SEQ ID NO: 70 com até 10 modificações de aminoácidos únicos. Em algumas modalidades, cada um dentre o primeiro e o segundo polipeptídeo compreende, consiste em, ou consiste essencialmente na sequência SEQ ID NO: 76 com até 10 modificações de aminoácidos únicos, contanto que a posição 72 da SEQ ID NO: 76 seja uma prolina e a posição 319 da SEQ ID NO: 76 seja uma prolina, e cada um dentre o terceiro e o quarto polipeptídeo compreende, consiste em, ou consiste essencialmente na sequência SEQ ID NO: 70 com até 10 modificações de aminoácidos únicos, contanto que a posição 72 da SEQ ID NO: 70 seja uma prolina.

[0058] Em algumas modalidades, cada um dentre o primeiro e o segundo polipeptídeo compreende, consiste em, ou consiste essencialmente na sequência

DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVS
HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPPEEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPVYTLPPCRDKLT
KNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKG
GGGGGGGGGGGGGGGGDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVS
HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPPEEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPVYTLPPCRDKLT
KNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPG (SEQ ID NO: 76), e cada um dentre o terceiro e o quarto polipeptídeo compreende, consiste em, ou consiste essencialmente na sequência

DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVS
HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPPEEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPVYTLPPCRDKLT
KNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPG (SEQ ID NO: 76), e cada um dentre o terceiro e o quarto polipeptídeo compreende, consiste em, ou consiste essencialmente na sequência

KNQVSLSCAVDGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFF
LVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG (SEQ
ID NO: 70).

[0059] Em algumas modalidades, cada um dentre o primeiro e o segundo polipeptídeo compreende, consiste em, ou consiste essencialmente na sequência

DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVS
HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPPEEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCRDKLT
KNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFF
LYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKG
GGGGGGGGGGGGGGGGDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKP
KDTLMASRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPPE
EQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK
GQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQ
PENNYKTPPVLKSDGSFFLYSDLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEAL
HNHYTQKSLSLSPG (SEQ ID NO: 77), e cada um dentre o terceiro e
o quarto polipeptídeo compreende, consiste em, ou consiste essencialmente na sequência

DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVS
HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPPEEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPPSRDELT
KNQVSLSCAVDGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFF
LVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG (SEQ
ID NO: 70). Em algumas modalidades, cada um dentre o primeiro e o segundo polipeptídeo compreende, consiste em, ou consiste essencialmente na sequência SEQ ID NO: 77 com até 10 (por exemplo, até 9,
8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 ou 1) modificações de aminoácidos únicos (por exemplo, substituições, por exemplo, substituições conservativas) e
cada um dentre o terceiro e o quarto polipeptídeo compreende, consis-

te em, ou consiste essencialmente na sequência SEQ ID NO: 70 com até 10 (9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 ou 1) modificações de aminoácidos únicos (por exemplo, substituições, por exemplo, substituições conservativas). Em algumas modalidades, cada um dentre o primeiro e o segundo polipeptídeo compreende, consiste em, ou consiste essencialmente na sequência SEQ ID NO: 77 com até 10 (por exemplo, não mais que 1, não mais que 2, não mais que 3, não mais que 4, não mais que 5, não mais que 6, não mais que 7, não mais que 8, não mais que 9) modificações de aminoácidos únicos na região fora do peptídeo de ligação (por exemplo, a subsequência GGGGGGGGGGGGGGGGGGG (SEQ ID NO: 23); o peptídeo de ligação dentro da SEQ ID NO:77 pode ser substituído por um peptídeo de ligação alternativo), e cada um dentre o terceiro e o quarto polipeptídeo compreende, consiste em, ou consiste essencialmente na sequência SEQ ID NO: 70 com até 10 modificações de aminoácidos únicos. Em algumas modalidades, cada um dentre o primeiro e o segundo polipeptídeo compreende, consiste em, ou consiste essencialmente na sequência SEQ ID NO: 77 com até 10 modificações de aminoácidos únicos, contanto que a posição 72 da SEQ ID NO: 77 seja prolina, a posição 134 da SEQ ID NO: 77 seja cisteína, a posição 137 da SEQ ID NO: 77 seja lisina, a posição 146 da SEQ ID NO: 77 seja triptofano, a posição 280 da SEQ ID NO: 77 seja alanina, a posição 319 da SEQ ID NO: 77 seja prolina, a posição 426 da SEQ ID NO: 77 seja lisina e a posição 436 da SEQ ID NO: 77 seja ácido aspártico, e cada um dentre o terceiro e o quarto polipeptídeo compreende, consiste em, ou consiste essencialmente na sequência SEQ ID NO: 70 com até 10 modificações de aminoácidos únicos, contanto que a posição 72 da SEQ ID NO: 70 seja uma prolina.

[0060] Em algumas modalidades, cada um dentre o primeiro e o segundo polipeptídeo compreende, consiste em, ou consiste essencialmente na sequência

DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMASRTPEVTCVVVDVS
HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPPEEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPVYTLPPCRDKLT
KNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKG
GGGGGGGGGGGGGGGGDKHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMASRTPEVTCVVVDVS
HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPPEEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPVYTLPPSRDELT
KNQVSLSCAVDGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG (SEQ ID NO: 79), e cada um dentre o terceiro e o quarto polipeptídeo compreende, consiste em, ou consiste essencialmente na sequência

DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMASRTPEVTCVVVDVS
HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPPEEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPVYTLPPSRDELT
KNQVSLSCAVDGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG (SEQ ID NO: 73). Em algumas modalidades, cada um dentre o primeiro e o segundo polipeptídeo compreende, consiste em, ou consiste essencialmente na sequência SEQ ID NO: 79 com até 10 (por exemplo, até 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 ou 1) modificações de aminoácidos únicos (por exemplo, substituições, por exemplo, substituições conservativas) e cada um dentre o terceiro e o quarto polipeptídeo compreende, consiste em, ou consiste essencialmente na sequência SEQ ID NO: 73 com até 10 (9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 ou 1) modificações de aminoácidos únicos (por exemplo, substituições, por exemplo, substituições conservativas). Em algumas modalidades, cada um dentre o primeiro e o segundo polipeptídeo compreende, consiste em, ou consiste essencialmente na sequência SEQ ID NO: 79 com até 10 (por exemplo, não mais que 1,

não mais que 2, não mais que 3, não mais que 4, não mais que 5, não mais que 6, não mais que 7, não mais que 8, não mais que 9) modificações de aminoácidos únicos na região fora do peptídeo de ligação (por exemplo, a subsequência GGGGGGGGGGGGGGGGGGG (SEQ ID NO: 23); o peptídeo de ligação dentro da SEQ ID NO:79 pode ser substituído por um peptídeo de ligação alternativo), e cada um dentre o terceiro e o quarto polipeptídeo compreende, consiste em, ou consiste essencialmente na sequência SEQ ID NO: 73 com até 10 modificações de aminoácidos únicos. Em algumas modalidades, cada um dentre o primeiro e o segundo polipeptídeo compreende, consiste em, ou consiste essencialmente na sequência SEQ ID NO: 79 com até 10 modificações de aminoácidos únicos, contanto que a posição 33 da SEQ ID NO: 79 seja alanina, a posição 72 da SEQ ID NO: 79 seja prolina, a posição 280 da SEQ ID NO: 79 seja alanina e a posição 319 da SEQ ID NO: 79 seja prolina, e cada um dentre o terceiro e o quarto polipeptídeo compreende, consiste em, ou consiste essencialmente na sequência SEQ ID NO: 73 com até 10 modificações de aminoácidos únicos, contanto que a posição 33 da SEQ ID NO: 73 seja uma alanina e a posição 72 da SEQ ID NO: 73 seja uma prolina. Em algumas modalidades, o construto de Fc é o construto 4, o construto 5, o construto 6, o construto 7, o construto 8, o construto 9, o construto 10, o construto 11, o construto 12, o construto 13, o construto 14, o construto 15, o construto 16, o construto 17, o construto 18 ou o construto 19.

[0061] Em algumas modalidades, o construto de Fc é o construto 5, o construto 6, o construto 7, o construto 9, o construto 10, o construto 11, o construto 13, o construto 14, o construto 15, o construto 16, o construto 17, o construto 18 ou o construto 19.

[0062] Em algumas modalidades, cada um dentre o primeiro polipeptídeo, o segundo polipeptídeo, o terceiro polipeptídeo e/ou o quarto polipeptídeo inclui uma substituição de aminoácido D para Q N-

terminal.

[0063] Em um segundo aspecto, um construto de Fc da descrição incluindo (i) um primeiro domínio Fc incluindo um primeiro monômero de domínio Fc e um segundo monômero de domínio Fc e (ii) um segundo domínio Fc incluindo um terceiro monômero de domínio Fc e um quarto monômero de domínio Fc, em que pelo menos um domínio Fc inclui uma modificação de aminoácido na posição I253. Em outro aspecto, um construto de Fc da descrição incluindo (i) um primeiro domínio Fc incluindo um primeiro monômero de domínio Fc e um segundo monômero de domínio Fc e (ii) um segundo domínio Fc incluindo um terceiro monômero de domínio Fc e um quarto monômero de domínio Fc, em que pelo menos um monômero de domínio Fc inclui uma substituição de aminoácido na posição I253. Em algumas modalidades, cada uma das modificações de aminoácidos (por exemplo, substituições) na posição I253 é independentemente selecionada do grupo consistindo em I253A, I253C, I253D, I253E, I253F, I253G, I253H, I253I, I253K, I253L, I253M, I253N, I253P, I253Q, I253R, I253S, I253T, I253V, I253W e I253Y. Em algumas modalidades, a modificação de aminoácido (por exemplo, substituição) na posição I253 é I253A. Em algumas modalidades, o construto de Fc inclui pelo menos uma modificação de aminoácido (por exemplo, substituição) na posição R292. Em algumas modalidades, a modificação de aminoácido (por exemplo, substituição) na posição R292 é selecionada do grupo consistindo em R292D, R292E, R292L, R292P, R292Q, R292R, R292T e R292Y. Em algumas modalidades, a modificação de aminoácido (por exemplo, substituição) na posição R292 é R292P.

[0064] Em algumas modalidades, o primeiro monômero de domínio Fc e o terceiro monômero de domínio Fc são unidos por um peptídeo de ligação (por exemplo, um espaçador). Em algumas modalidades, o segundo monômero de domínio Fc e o quarto monômero de

domínio Fc são unidos por um peptídeo de ligação (por exemplo, um espaçador). Em algumas modalidades, cada peptídeo de ligação (por exemplo, espaçador) é independentemente selecionado de um polipeptídeo tendo a sequência GGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGG (SEQ ID NO: 23), GGGGS (SEQ ID NO: 1), GGSG (SEQ ID NO: 2), SGGG(SEQ ID NO: 3), GSGS (SEQ ID NO: 4), GSGSGS (SEQ ID NO: 5), GSGSGSGS (SEQ ID NO: 6), GSGSGSGSGS (SEQ ID NO: 7), GSGSGSGSGSGS (SEQ ID NO: 8), GGSGGS (SEQ ID NO: 9), GGSGGSGGS (SEQ ID NO: 10), GGSGGSGGS (SEQ ID NO: 11), GGSGGGSG (SEQ ID NO: 12), GGSGGGSGGGSG (SEQ ID NO: 13), GGSGGGSGGSGGGSG (SEQ ID NO: 14), GGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSG (SEQ ID NO: 80), GENLYFQSGG (SEQ ID NO: 28), SACYCELS (SEQ ID NO: 29), RSIAT (SEQ ID NO: 30), RPACKIPNDLKQKVMNH (SEQ ID NO: 31), GGSAGGSGSGSSGGSSGASGTGTAGGTGSGSGTGSG (SEQ ID NO: 32), AAANSSIDLISVPVDSR (SEQ ID NO: 33), GGSGGGSEGGGSEGGGSEGGGSEGGGSEGGGSGGG (SEQ ID NO: 34), GGGSGGGSGGGSGGGSGGG (SEQ ID NO: 35), SGGSGGGSGGGSGGGSGGG (SEQ ID NO: 18), GGSGGGSGGGSGGGSGGS (SEQ ID NO: 36), GGGG (SEQ ID NO: 19), GGGGGGGGG (SEQ ID NO: 20), GGGGGGGGGGGGG (SEQ ID NO: 21), ou GGGGGGGGGGGGGGG (SEQ ID NO: 22).

[0065] Em algumas modalidades, o primeiro monômero de domínio Fc e o segundo monômero de domínio Fc incluem módulos de seletividade de dimerização complementares que promovem a dimerização entre o primeiro monômero de domínio Fc e o segundo monômero de domínio Fc. Em algumas modalidades, o terceiro monômero de domínio Fc e o quarto monômero de domínio Fc incluem módulos de seletividade de dimerização complementares que promovem a dimerização entre o terceiro monômero de domínio Fc e o quarto monômero

de domínio Fc.

[0066] Em outro aspecto, a descrição fornece um construto de Fc incluindo (i) um primeiro domínio Fc incluindo um primeiro monômero de domínio Fc e um segundo monômero de domínio Fc e (ii) um segundo domínio Fc incluindo um terceiro monômero de domínio Fc e um quarto monômero de domínio Fc, em que pelo menos um domínio Fc inclui uma modificação de aminoácido na posição R292. Em outro aspecto, a descrição fornece um construto de Fc incluindo (i) um primeiro domínio Fc incluindo um primeiro monômero de domínio Fc e um segundo monômero de domínio Fc e (ii) um segundo domínio Fc incluindo um terceiro monômero de domínio Fc e um quarto monômero de domínio Fc, em que pelo menos um monômero de domínio Fc inclui uma substituição de aminoácido na posição R292. Em algumas modalidades, cada uma das modificações de aminoácidos (por exemplo, substituições) na posição R292 é independentemente selecionada do grupo consistindo em R292D, R292E, R292L, R292P, R292Q, R292R, R292T e R292Y. Em algumas modalidades, a modificação de aminoácido (por exemplo, substituição) na posição R292 é R292P. Em algumas modalidades, o primeiro monômero de domínio Fc e o terceiro monômero de domínio Fc são unidos por um peptídeo de ligação.

[0067] Em algumas modalidades, o segundo monômero de domínio Fc e o quarto monômero de domínio Fc são unidos por um peptídeo de ligação. Em algumas modalidades, cada peptídeo de ligação é independentemente selecionado de um polipeptídeo tendo a sequência GGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGG (SEQ ID NO: 23), GGGGS (SEQ ID NO: 1), GGSG (SEQ ID NO: 2), SGGS (SEQ ID NO: 3), GSGS (SEQ ID NO: 4), GSGSGS (SEQ ID NO: 5), GSGSGSGS (SEQ ID NO: 6), GSGSGSGSGS (SEQ ID NO: 7), GSGSGSGSGSGS (SEQ ID NO: 8), GGSGGGS (SEQ ID NO: 9), GGSGGSGGGS (SEQ ID NO: 10), GGSGGSGGSGGS (SEQ ID NO: 11), GGSGGGSG (SEQ ID NO:

12), GGSGGGSGGGSG (SEQ ID NO: 13), GGSGGGSGGGSGGGSG (SEQ ID NO: 14), GGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSG (SEQ ID NO: 80), GENLYFQSGG (SEQ ID NO: 28), SACYCELS (SEQ ID NO: 29), RSIAT (SEQ ID NO: 30), RPACKIPNDLKQKVMNH (SEQ ID NO: 31), GGSAAGGSGSGSSGGSSGASGTGTAGGTGSGSGTGSG (SEQ ID NO: 32), AAANSSIDLISVPVDSR (SEQ ID NO: 33), GGSGGGSEGGGSEGGGSEGGGSEGGGSEGGGSGGG (SEQ ID NO: 34), GGGSGGGSGGG (SEQ ID NO: 35), SGGSGGGSGGSGGGSGGG (SEQ ID NO: 18), GGSGGGSGGGSGGGSGGG (SEQ ID NO: 36), GGGG (SEQ ID NO: 19), GGGGGGGGG (SEQ ID NO: 20), GGGGGGGGGGGGGGG (SEQ ID NO: 21), ou GGGGGGGGGGGGGGGGG (SEQ ID NO: 22). Em algumas modalidades, o peptídeo de ligação é GGGGGGGGGGGGGGGGGGG (SEQ ID NO: 23).

[0068] Em certas modalidades, o primeiro monômero de domínio Fc e o segundo monômero de domínio Fc compreendem módulos de seletividade de dimerização complementares que promovem a dimerização entre o primeiro monômero de domínio Fc e o segundo monômero de domínio Fc. Em algumas modalidades, o terceiro monômero de domínio Fc e o quarto monômero de domínio Fc compreendem módulos de seletividade de dimerização complementares que promovem a dimerização entre o terceiro monômero de domínio Fc e o quarto monômero de domínio Fc.

[0069] Em outro aspecto, a descrição apresenta um método de preparação de um construto de Fc descrito neste documento. O método inclui: a) fornecimento de uma célula hospedeira que inclui polinucleotídeos que codificam os polipeptídeos da descrição; b) expressão dos polipeptídeos na célula hospedeira em condições que permitem a formação do construto de Fc; e c) recuperação do construto de

Fc.

[0070] Em outro aspecto, a descrição fornece um construto de Fc compreendendo: a) um primeiro polipeptídeo compreendendo i). um primeiro monômero de domínio Fc; ii). um segundo monômero de domínio Fc; e iii) um peptídeo de ligação que une o primeiro monômero de domínio Fc ao segundo monômero de domínio Fc; b). um segundo polipeptídeo compreendendo i). um terceiro monômero de domínio Fc; ii). um quarto monômero de domínio Fc; e iii) um peptídeo de ligação que une o terceiro monômero de domínio Fc ao quarto monômero de domínio Fc; c). um terceiro polipeptídeo compreende um quinto monômero de domínio Fc; e d). um quarto polipeptídeo compreende um sexto monômero de domínio Fc; em que o primeiro monômero de domínio Fc e o quinto monômero de domínio Fc se combinam para formar um primeiro domínio Fc, o segundo monômero de domínio Fc e o quarto monômero de domínio Fc se combinam para formar um segundo domínio Fc, e o terceiro monômero de domínio Fc e o sexto monômero de domínio Fc se combinam para formar um terceiro domínio Fc, e em que pelo menos um domínio Fc compreende uma modificação de aminoácido na posição I253; em que cada um dentre o primeiro e o segundo polipeptídeo compreende a sequênciа

DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMASRTPEVTCVVVDVS
 HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPPEEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPVYTLPPCRDKLT
 KNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKG
 GGGGGGGGGGGGGGGDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTPPE
 EQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQ
 PENNYKTTPPVLKSDGSFFLYSDLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEAL

HNHYTQKSLSLSPG (SEQ ID NO: 78), e cada um dentre o terceiro e quarto polipeptídeos compreende a sequência

DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMASRTPEVTCVVVDVS
HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTPPEEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPVQVCTLPPSRDELT
KNQVSLSCAVDGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFF
LVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG (SEQ ID NO: 73). Em outro aspecto, a descrição fornece um construto de Fc compreendendo: a) um primeiro polipeptídeo compreendendo i). um primeiro monômero de domínio Fc; ii). um segundo monômero de domínio Fc; e iii) um peptídeo de ligação que une o primeiro monômero de domínio Fc ao segundo monômero de domínio Fc; b). um segundo polipeptídeo compreendendo i). um terceiro monômero de domínio Fc; ii). um quarto monômero de domínio Fc; e iii) um peptídeo de ligação que une o terceiro monômero de domínio Fc ao quarto monômero de domínio Fc; c). um terceiro polipeptídeo compreende um quinto monômero de domínio Fc; e d). um quarto polipeptídeo compreende um sexto monômero de domínio Fc; em que o primeiro monômero de domínio Fc e o quinto monômero de domínio Fc se combinam para formar um primeiro domínio Fc, o segundo monômero de domínio Fc e o quarto monômero de domínio Fc se combinam para formar um segundo domínio Fc, e o terceiro monômero de domínio Fc e o sexto monômero de domínio Fc se combinam para formar um terceiro domínio Fc, e em que cada um dentre o primeiro e o segundo polipeptídeo compreende a sequência

DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMASRTPEVTCVVVDVS
HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTPPEEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPVQVYTLPPCRDKLT
KNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFF
LYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKG

GGGGGGGGGGGGGGGGDKHTCPPCPAPELLGGPSVFLPPKP
 KDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPPE
 EQYNSTYRVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIKAK
 GQPREPVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQ
 PENNYKTPPVLSKSDGSFFLYSDLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEAL
 HNHYTQKSLSLSPG (SEQ ID NO: 78), e cada um dentre o terceiro e
 quarto polipeptídeos compreende a sequência
 DKHTCPPCPAPELLGGPSVFLPPKPDKTLMASRTPEVTCVVVDVS
 HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPPEEQYNSTYRVSVLTVLHQD
 WLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIKAKGQPREPVYTLPPSRDELT
 KNQVSLSCAVDGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFF
 LVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG (SEQ
 ID NO: 73).

[0071] Em outro aspecto, a descrição fornece um construto de Fc
 compreendendo a) um primeiro polipeptídeo compreendendo i). um
 primeiro monômero de domínio Fc; ii). um segundo monômero de do-
 mímio Fc; e iii) um peptídeo de ligação que une o primeiro monômero
 de domínio Fc ao segundo monômero de domínio Fc; b). um segundo
 polipeptídeo compreendendo i). um terceiro monômero de domínio Fc;
 ii). um quarto monômero de domínio Fc; e iii) um peptídeo de ligação
 que une o terceiro monômero de domínio Fc ao quarto monômero de
 domínio Fc; c). um terceiro polipeptídeo compreende um quinto mo-
 nômero de domínio Fc; e d). um quarto polipeptídeo compreende um
 sexto monômero de domínio Fc; em que o primeiro monômero de do-
 mímio Fc e o quinto monômero de domínio Fc se combinam para for-
 mar um primeiro domínio Fc, o segundo monômero de domínio Fc e o
 quarto monômero de domínio Fc se combinam para formar um segun-
 do domínio Fc, e o terceiro monômero domínio Fc e o sexto monômero
 de domínio Fc se combinam para formar um terceiro domínio Fc, e em
 que pelo menos um domínio Fc compreende uma modificação de ami-

noácido na posição I253; em que cada um dentre o primeiro e o segundo polipeptídeo compreende a sequênciа

DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMASRTPEVTCVVVDVS
HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTPPEEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPVYTLPPCRDKLT
KNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFF
LYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKG
GGGGGGGGGGGGGGGGDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPK
KDTLMASRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTPPE
EQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK
GQPREPVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQ
PENNYKTPPVLDSDGSFFLYSDLTVKSRWQQGNVFSCSVMHEAL
HNHYTQKSLSLSPG (SEQ ID NO: 79), e cada um dentre o terceiro e
quarto polipeptídeos compreende a sequênciа

DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMASRTPEVTCVVVDVS
HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTPPEEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPVYTLPPSRDELT
KNQVSLSCAVDGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFF
LVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG (SEQ
ID NO: 73). Em outro aspecto, a descrição fornece um construto de Fc
compreendendo: a) um primeiro polipeptídeo compreendendo i). um
primeiro monômero de domínio Fc; ii). um segundo monômero de do-
mínio Fc; e iii) um peptídeo de ligação que une o primeiro monômero
de domínio Fc ao segundo monômero de domínio Fc; b). um segundo
polipeptídeo compreendendo i). um terceiro monômero de domínio Fc;
ii). um quarto monômero de domínio Fc; e iii) um peptídeo de ligação
que une o terceiro monômero de domínio Fc ao quarto monômero de
domínio Fc; c). um terceiro polipeptídeo compreende um quinto mo-
nômero de domínio Fc; e d). um quarto polipeptídeo compreende um
sexto monômero de domínio Fc; em que o primeiro monômero de do-

mínio Fc e o quinto monômero de domínio Fc se combinam para formar um primeiro domínio Fc, o segundo monômero de domínio Fc e o quarto monômero de domínio Fc se combinam para formar um segundo domínio Fc, e o terceiro monômero de domínio Fc e o sexto monômero de domínio Fc se combinam para formar um terceiro domínio Fc, e em que cada um dentre o primeiro e o segundo polipeptídeo compreende a sequência

DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMASRTPEVTCVVVDVS
 HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPPEEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPVYTLPPCRDKLT
 KNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKGGGGGGGGGGGGGGDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMASRTPEVTCVVVDVS
 EQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPVLDSDGSFFLYSDLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG (SEQ ID NO: 79), e cada um dentre o terceiro e quarto polipeptídeos compreende a sequência

DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMASRTPEVTCVVVDVS
 HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPPEEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPVYTLPPSRDELTKNQVSLSCAVDGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPVLDSDGSFFLYSDLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG (SEQ ID NO: 73).

[0072] Em outro aspecto, a descrição fornece um construto de Fc incluindo: a) um primeiro polipeptídeo incluindo i). um primeiro monômero de domínio Fc; ii). um segundo monômero de domínio Fc; e iii) um peptídeo de ligação que une o primeiro monômero de domínio Fc ao segundo monômero de domínio Fc; b). um segundo polipeptídeo

incluindo i). um terceiro monômero de domínio Fc; ii). um quarto monômero de domínio Fc; e iii) um peptídeo de ligação que une o terceiro monômero de domínio Fc ao quarto monômero de domínio Fc; c). um terceiro polipeptídeo compreende um quinto monômero de domínio Fc; e d). um quarto polipeptídeo compreende um sexto monômero de domínio Fc; em que o primeiro monômero de domínio Fc e o quinto monômero de domínio Fc se combinam para formar um primeiro domínio Fc, o segundo monômero de domínio Fc e o quarto monômero de domínio Fc se combinam para formar um segundo domínio Fc, e o terceiro monômero de domínio Fc e o sexto monômero de domínio Fc se combinam para formar um terceiro domínio Fc, e em que pelo menos um domínio Fc compreende uma modificação de aminoácido na posição R292; em que cada um dentre o primeiro e o segundo polipeptídeo inclui a sequência

DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVS
 HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPPEEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPVYTLPPCRDKLT
 KNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKG
 GGGGGGGGGGGGGGGDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVS
 HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPPEEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPVYTLPPRDEL
 TKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPVLDSDGSFFLYSDLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG (SEQ ID NO: 76), e cada um dentre o terceiro e o quarto polipeptídeo inclui a sequência

DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVS
 HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPPEEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPVYTLPPRDEL
 TKNQVSLSCAVDGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPVLDSDGSFFLYSDLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG

LVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG (SEQ ID NO: 70). Em outro aspecto, a descrição fornece um construto de Fc incluindo: a) um primeiro polipeptídeo incluindo i). um primeiro monômero de domínio Fc; ii). um segundo monômero de domínio Fc; e iii) um peptídeo de ligação que une o primeiro monômero de domínio Fc ao segundo monômero de domínio Fc; b). um segundo polipeptídeo incluindo i). um terceiro monômero de domínio Fc; ii). um quarto monômero de domínio Fc; e iii) um peptídeo de ligação que une o terceiro monômero de domínio Fc ao quarto monômero de domínio Fc; c). um terceiro polipeptídeo compreende um quinto monômero de domínio Fc; e d). um quarto polipeptídeo compreende um sexto monômero de domínio Fc; em que o primeiro monômero de domínio Fc e o quinto monômero de domínio Fc se combinam para formar um primeiro domínio Fc, o segundo monômero de domínio Fc e o quarto monômero de domínio Fc se combinam para formar um segundo domínio Fc, e o terceiro monômero de domínio Fc e o sexto monômero de domínio Fc se combinam para formar um terceiro domínio Fc, e em que cada um dentre o primeiro e o segundo polipeptídeo inclui a sequência
DKHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVS
HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPPEEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPVYTLPPCRDKLT
KNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFF
LYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKG
GGGGGGGGGGGGGGGGDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKP
KDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPPE
EQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK
GQPREPVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQ
PENNYKTPPVLDSDGSFFLYSDLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEAL
HNHYTQKSLSLSPG (SEQ ID NO: 76), e cada um dentre o terceiro e o quarto polipeptídeo inclui a sequência

DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVS
HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPPEEQYNSTYRVVSVLTVLHQD
WLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIISKAKGQPREPQVCTLPPSRDELT
KNQVSLSCAVDGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFF
LVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG (SEQ
ID NO: 70).

[0073] Em algumas modalidades de qualquer um dos construtos de Fc descritos neste documento, cada domínio Fc é independentemente um domínio Fc de IgG1, um domínio Fc de IgG2, um domínio Fc de IgG3, um domínio Fc de IgG4, ou uma combinação destes. Em algumas modalidades de qualquer um dos construtos de Fc descritos neste documento, cada domínio Fc é independentemente um domínio Fc de IgG1, um domínio Fc de IgG2, um domínio Fc de IgG3, um domínio Fc de IgG4, ou uma combinação destes com até 10 (por exemplo, até 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 ou 10) modificações de aminoácidos únicos. Em algumas modalidades, cada domínio Fc é um domínio Fc de IgG1. Em algumas modalidades, cada domínio Fc é um domínio Fc de IgG2. Em algumas modalidades, cada domínio Fc é um domínio Fc de IgG3. Em algumas modalidades, cada um dentre os primeiro, segundo e terceiro domínios Fc são domínios Fc de IgG1. Em algumas modalidades, cada domínio Fc é um domínio Fc de IgG1 humana. Em algumas modalidades, cada domínio Fc compreende a SEQ ID NO: 42 com até 10 (por exemplo, não mais que 1, não mais que 2, não mais que 3, não mais que 4, não mais que 5, não mais que 6, não mais que 7, não mais que 8, não mais que 9) modificações de aminoácidos únicos.

[0074] Em algumas modalidades de qualquer um dos construtos de Fc descritos neste documento, um ou mais dos monômeros de domínio Fc é um monômero de domínio Fc de IgG humana com até dez (por exemplo, até 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 ou 10) modificações de ami-

noácidos. Em algumas modalidades de qualquer um dos construtos de Fc descritos neste documento, cada monômero de domínio Fc não tem mais do que dez (por exemplo, não mais do que 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 ou 10) modificações de aminoácidos. Em algumas modalidades de qualquer um dos construtos de Fc descritos neste documento, cada monômero de Fc compreende a sequência da SEQ ID NO: 42 com não mais do que dez (por exemplo, não mais do que 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 ou 10) modificações de aminoácidos. Em algumas modalidades de qualquer um dos construtos de Fc descritos neste documento, cada monômero de Fc compreende a sequência da SEQ ID NO: 42 com 5 modificações de aminoácidos. Em algumas modalidades de qualquer um dos construtos de Fc descritos neste documento, cada monômero de Fc compreende a sequência da SEQ ID NO: 42 com 10 modificações de aminoácidos. Em algumas modalidades de qualquer um dos construtos de Fc descritos neste documento, cada monômero de Fc compreende a sequência da SEQ ID NO: 42 com 8 modificações de aminoácidos. Em cada caso, as modificações podem incluir uma ou ambas as substituições de aminoácidos I253A e R292P.

[0075] Em outro aspecto, a descrição apresenta uma célula hospedeira que expressa um construto de Fc descrito neste documento. A célula hospedeira inclui polinucleotídeos que codificam os polipeptídeos da descrição, em que os polinucleotídeos são expressos na célula hospedeira.

[0076] Em outro aspecto, a descrição fornece um polipeptídeo que compreende uma sequência de aminoácidos selecionada do grupo consistindo na SEQ ID NO: 43-79. Em outro aspecto, a descrição fornece um polipeptídeo que compreende uma sequência de aminoácidos selecionada do grupo consistindo na SEQ ID NO: 49 e SEQ ID NO: 61-79.

[0077] Em outro aspecto, a descrição fornece uma composição

compreendendo ou consistindo na sequência: SEQ ID NO: 78 e um polipeptídeo compreendendo ou consistindo na sequência: SEQ ID NO: 73. Em outro aspecto, a descrição fornece uma composição compreendendo ou consistindo na sequência: SEQ ID NO: 49 e um polipeptídeo compreendendo ou consistindo na sequência: SEQ ID NO: 61. Em outro aspecto, a descrição fornece uma composição compreendendo ou consistindo na sequência: SEQ ID NO: 62 e um polipeptídeo compreendendo ou consistindo na sequência: SEQ ID NO: 61. Em outro aspecto, a descrição fornece uma composição compreendendo ou consistindo na sequência: SEQ ID NO: 64 e um polipeptídeo compreendendo ou consistindo na sequência: SEQ ID NO: 63. Em outro aspecto, a descrição fornece uma composição compreendendo ou consistindo na sequência: SEQ ID NO: 65 e um polipeptídeo compreendendo ou consistindo na sequência: SEQ ID NO: 63. Em outro aspecto, a descrição fornece uma composição compreendendo ou consistindo na sequência: SEQ ID NO: 67 e um polipeptídeo compreendendo ou consistindo na sequência: SEQ ID NO: 61. Em outro aspecto, a descrição fornece uma composição compreendendo ou consistindo na sequência: SEQ ID NO: 68 e um polipeptídeo compreendendo ou consistindo na sequência: SEQ ID NO: 63. Em outro aspecto, a descrição fornece uma composição compreendendo ou consistindo na sequência: SEQ ID NO: 69 e um polipeptídeo compreendendo ou consistindo na sequência: SEQ ID NO: 63. Em outro aspecto, a descrição fornece uma composição compreendendo ou consistindo na sequência: SEQ ID NO: 72 e um polipeptídeo compreendendo ou consistindo na sequência: SEQ ID NO: 70. Em outro aspecto, a descrição fornece uma composição compreendendo ou consistindo na sequência: SEQ ID NO: 74 e um polipeptídeo compreendendo ou consistindo na sequência: SEQ ID NO: 73. Em outro aspecto, a descrição fornece uma composição

compreendendo ou consistindo na sequência: SEQ ID NO: 75 e um polipeptídeo compreendendo ou consistindo na sequência: SEQ ID NO: 73. Em outro aspecto, a descrição fornece uma composição compreendendo ou consistindo na sequência: SEQ ID NO: 77 e um polipeptídeo compreendendo ou consistindo na sequência: SEQ ID NO: 70. Em outro aspecto, a descrição fornece uma composição compreendendo ou consistindo na sequência: SEQ ID NO: 79 e um polipeptídeo compreendendo ou consistindo na sequência: SEQ ID NO: 73. Em outro aspecto, a descrição fornece uma composição compreendendo ou consistindo na sequência: SEQ ID NO: 76 e um polipeptídeo compreendendo ou consistindo na sequência: SEQ ID NO: 70.

[0078] Em algumas modalidades, as composições incluem os primeiro e segundo polipeptídeos listados presentes em uma razão molar entre 1,1:1 e 1:1,1.

[0079] Em outro aspecto, a descrição fornece um método para tratar um paciente compreendendo administrar ao paciente qualquer uma das composições descritas neste documento.

[0080] Em outro aspecto, a descrição apresenta uma composição farmacêutica incluindo uma população substancialmente homogênea (por exemplo, pelo menos 85%, 90%, 95%, 97%, 98%, 99% homogênea) de um construto de Fc descrito neste documento (por exemplo, um construto de Fc tendo três domínios Fc) ou uma composição que inclui uma população substancialmente homogênea de um construto de Fc descrito neste documento (por exemplo, uma composição incluindo uma população substancialmente homogênea de um construto de Fc tendo três domínios Fc) e um ou mais veículos ou excipientes farmaceuticamente aceitáveis. Essas composições farmacêuticas podem ser produzidas sem agregação substancial ou multimerização indesejada de construtos de Fc.

[0081] Em alguns aspectos, a descrição fornece uma composição incluindo um polipeptídeo incluindo a SEQ ID NO: 76 e um polipeptídeo incluindo a SEQ ID NO: 70. Em alguns aspectos, a descrição fornece uma composição compreendendo um polipeptídeo incluindo a SEQ ID NO: 78 e um polipeptídeo incluindo a SEQ ID NO: 73. Em alguns aspectos, a descrição fornece uma composição compreendendo um polipeptídeo incluindo a SEQ ID NO: 79 e um polipeptídeo incluindo a SEQ ID NO: 73.

[0082] Em alguns aspectos, a descrição fornece um método para tratar um paciente incluindo administrar ao paciente qualquer uma das composições descritas neste documento.

[0083] Em alguns aspectos, a descrição fornece uma célula incluindo uma sequência de ácido nucleico que codifica a SEQ ID NO: 76 e uma sequência de ácido nucleico que codifica a SEQ ID NO: 70. Em alguns aspectos, a descrição fornece uma célula incluindo uma sequência de ácido nucleico que codifica a SEQ ID NO: 78 e uma sequência de ácido nucleico que codifica a SEQ ID NO: 73. Em alguns aspectos, a descrição fornece uma célula incluindo uma sequência de ácido nucleico que codifica a SEQ ID NO: 79 e uma sequência de ácido nucleico que codifica a SEQ ID NO: 73. Em alguns aspectos, a descrição fornece uma célula incluindo uma sequência de ácido nucleico que codifica qualquer um dos construtos de Fc descritos neste documento.

[0084] Em outro aspecto, a descrição apresenta um método de redução da ativação de células imunes da resposta imune em um sujeito, incluindo a administração, ao sujeito, de um construto de Fc descrito neste documento (por exemplo, um construto de Fc tendo três domínios Fc) ou uma composição incluindo uma população substancialmente homogênea de um construto de Fc descrito neste documento (por exemplo, uma composição incluindo uma população substancial-

mente homogênea de um construto de Fc tendo três domínios Fc). Em algumas modalidades, o sujeito tem uma doença autoimune.

[0085] Em outro aspecto, a descrição apresenta um método de tratamento da inflamação ou doença inflamatória em um sujeito, incluindo a administração, ao sujeito, de um construto de Fc descrito neste documento (por exemplo, um construto de Fc tendo três domínios Fc) ou uma composição incluindo uma população substancialmente homogênea de um construto de Fc descrito neste documento (por exemplo, uma composição incluindo uma população substancialmente homogênea de um construto de Fc tendo três domínios Fc).

[0086] Em outro aspecto, a descrição apresenta um método de promoção da depuração de autoanticorpos e/ou supressão da apresentação de antígeno em um sujeito, incluindo a administração, ao sujeito, de um construto de Fc descrito neste documento (por exemplo, um construto de Fc tendo três domínios Fc) ou uma composição incluindo uma população substancialmente homogênea de um construto de Fc descrito neste documento (por exemplo, uma composição incluindo uma população substancialmente homogênea de um construto de Fc tendo três domínios Fc).

[0087] Em algumas modalidades, doenças exemplares que podem ser tratadas através da administração de um construto de Fc descrito neste documento (por exemplo, um construto de Fc tendo três domínios Fc) incluem: artrite reumatoide (AR); lúpus eritematoso sistêmico (LES); vasculite associada ao ANCA; síndrome do anticorpo antifosfolipídeo, anemia hemolítica autoimune; neuropatia desmielinizante inflamatória crônica; depuração de aloanticorpos em transplantes, autoanticorpos na GVHD, anticorpos de reposição, terapêuticos com IgG, paraproteínas com IgG; dermatomiosite; Síndrome de Goodpasture; síndromes de hipersensibilidade do tipo II direcionada a órgãos e sistemas mediadas por citotoxicidade mediada por células dependente de

anticorpos, por exemplo, síndrome de Guillain-Barré, PDIC, dermatomiosite, síndrome de Felty, rejeição mediada por anticorpo, doença autoimune da tireoide, colite ulcerativa, doença hepática autoimune; púrpura trombocitopênica idiopática; Miastenia Gravis, neuromielite óptica; pênfigo e outros distúrbios bolhosos autoimunes; Síndrome de Sjögren; citopenias autoimunes e outros distúrbios mediados por fagocitose dependente de anticorpos; outras síndromes inflamatórias dependentes de FcR, por exemplo, sinovite, dermatomiosite, vasculite sistêmica, glomerulite e vasculite.

[0088] Em algumas modalidades, os construtos de Fc descritos neste documento não incluem uma região de reconhecimento de antígeno, por exemplo, um domínio variável ou uma região determinante de complementariedade (CDR). Em algumas modalidades, o construto de Fc (ou um domínio Fc dentro de um construto de Fc) é formado inteiramente ou em parte por associação de monômeros de domínio Fc que estão presentes em diferentes polipeptídeos. Em algumas modalidades, os construtos de Fc descritos neste documento incluem uma região de reconhecimento de antígeno, por exemplo, um domínio variável ou uma CDR. Em determinadas modalidades, o construto de Fc não inclui um domínio adicional (por exemplo, uma tailpiece de IgM ou uma tailpiece de IgA) que promova a associação de dois polipeptídeos. Em outras modalidades, ligações covalentes estão presentes no construto de Fc apenas entre dois monômeros de domínio Fc que se unem para formar um domínio Fc. Em outras modalidades, o construto de Fc não inclui ligações covalentes entre domínios Fc. Em ainda outras modalidades, o construto de Fc fornece flexibilidade estrutural suficiente de modo que todos ou substancialmente todos os domínios Fc no construto de Fc sejam capazes de interagir simultaneamente com um receptor Fc em uma superfície celular. Em uma modalidade, os monômeros de domínio são diferentes na sequência primária do

tipo selvagem ou entre si por terem módulos de seletividade de dimerização.

[0089] Os monômeros de domínio Fc de um domínio Fc do construto podem ter a mesma sequência primária de aminoácidos. Por exemplo, os monômeros de domínio Fc de um domínio Fc podem ter o mesmo módulo de seletividade de dimerização, por exemplo, ambos os monômeros de domínio Fc de um domínio Fc podem ter mutações de carga inversa em pelo menos duas posições dentro do anel de resíduos carregados na interface entre os domínios C_H3. Em algumas modalidades, o primeiro polipeptídeo e o segundo polipeptídeo têm a mesma sequência de aminoácidos. Em algumas modalidades, os terceiro e o quarto polipeptídeo do construto de Fc têm a mesma sequência de aminoácidos. Em algumas modalidades, a sequência do primeiro monômero de domínio Fc é diferente da sequência do quinto monômero de domínio Fc. Em algumas modalidades, a sequência do terceiro monômero de domínio Fc é diferente da sequência do sexto monômero de domínio Fc. Em algumas modalidades, a sequência do segundo monômero de domínio Fc é a mesma sequência do quarto monômero de domínio Fc.

[0090] Em qualquer um dos construtos de Fc descritos neste documento, os monômeros de domínio Fc de um domínio Fc de um construto podem ter diferentes sequências, por exemplo, sequências que diferem em não mais que 20 aminoácidos (por exemplo, não mais que 15, 10 aminoácidos), por exemplo, não mais que 20, 15, 10, 8, 7, 6, 5, 4, 3 ou 2 aminoácidos, entre dois monômeros de domínio Fc (isto é, entre o monômero de domínio Fc e outro monômero do construto de Fc). Por exemplo, sequências do monômero de domínio Fc de um construto descrito neste documento podem ser diferentes pois módulos de seletividade de dimerização complementares de qualquer um dos construtos de Fc podem incluir uma cavidade manipulada no do-

mínio constante de anticorpo C_H3 de um dos monômeros do domínio e uma protuberância manipulada no domínio constante de anticorpo C_H3 do outro dos monômeros de domínio Fc, em que a cavidade manipulada e a protuberância manipulada são posicionadas para formar um par de protuberância-em-cavidade dos monômeros de domínio Fc. Em algumas modalidades, os construtos de Fc incluem modificações de aminoácidos no domínio C_H3. Em algumas modalidades, os construtos de Fc incluem modificações de aminoácidos no domínio C_H3 dos monômeros de domínio Fc (um ou mais dos monômeros de domínio Fc) para dimerização seletiva. Cavidades e protuberâncias manipuladas exemplares são mostradas na Tabela 1. Em outras modalidades, os módulos de seletividade de dimerização complementares incluem um aminoácido negativamente carregado manipulado (substituído) no domínio constante de anticorpo C_H3 de um dos monômeros do domínio e um aminoácido positivamente carregado manipulada (substituído) no domínio constante de anticorpo C_H3 do outro dos monômeros de domínio Fc, em que o aminoácido negativamente carregado e o aminoácido positivamente carregado são posicionados para promover a formação de um domínio Fc entre os monômeros do domínio complementar. Alterações de aminoácidos complementares exemplares são mostradas nas Tabelas 2A-2C. Em algumas modalidades, um ou mais dos monômeros de domínio Fc são a mesma sequência. Em algumas modalidades, um ou mais dos monômeros de domínio Fc têm as mesmas modificações. Em algumas modalidades, apenas um, dois, três ou quatro dos monômeros de domínio Fc têm as mesmas modificações.

[0091] Em alguns casos, o domínio Fc inclui pelo menos uma modificação de aminoácido, em que as modificações de aminoácidos alteram um ou mais dentre (i) afinidade de ligação a um ou mais receptores Fc, (ii) funções efetoras, (iii) o nível de sulfatação do domínio Fc,

(iv) meia-vida, (v) resistência à protease, (vi) estabilidade do domínio Fc, e/ou (vii) susceptibilidade à degradação (por exemplo, em comparação ao domínio Fc não modificado). Em alguns casos, o domínio Fc inclui não mais de 16 modificações de aminoácidos (por exemplo, mais de 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, ou 16 modificações de aminoácidos). Em alguns casos, o domínio Fc inclui não mais de 16 modificações de aminoácidos (por exemplo, mais de 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, ou 16 modificações de aminoácidos no domínio CH3).

[0092] A descrição também apresenta uma composição farmacêutica que inclui uma população substancialmente homogênea de qualquer construto de Fc descrito neste documento. Em uma modalidade, uma seringa ou frasco estéril qualificado para uso farmacêutico contém uma composição farmacêutica, em que o único ingrediente ativo ou ingrediente ativo primário é uma população substancialmente homogênea de qualquer um dos construtos de Fc descritos neste documento. A composição farmacêutica pode incluir um ou mais ingredientes inativos, por exemplo, selecionados dentre sais, detergentes, tensioativos, agentes espessantes, polímeros, conservantes e outros excipientes farmacêuticos.

[0093] Em algumas modalidades, o construto de Fc é formado, pelo menos em parte, pela associação de monômeros de domínio Fc que estejam presentes em diferentes polipeptídeos. Em certas modalidades, o construto de Fc é formado pela associação de monômeros de domínio Fc que estejam presentes em diferentes polipeptídeos. Nessas modalidades, o construto de Fc não inclui um domínio adicional que promove a associação de dois polipeptídeos (por exemplo, uma tailpiece de IgM ou uma tailpiece de IgA). Em outras modalidades, ligações covalentes (por exemplo, pontes dissulfeto) estão presentes apenas entre dois monômeros de domínio Fc que se unem pa-

ra formar um domínio Fc. Em outras modalidades, o construto de Fc não inclui ligações covalentes (por exemplo, pontes dissulfeto) entre domínios Fc. Em ainda outras modalidades, o construto de Fc fornece flexibilidade estrutural suficiente de modo que todos ou substancialmente todos os domínios Fc no construto de Fc sejam capazes de interagir simultaneamente com um receptor Fc em uma superfície celular. Em certos exemplos de qualquer uma dessas modalidades, o construto de Fc inclui pelo menos dois domínios Fc unidos através de um peptídeo de ligação (por exemplo, um espaçador flexível de aminoácidos).

[0094] Em outro aspecto, a descrição apresenta composições e métodos para promover a dimerização seletiva de monômeros de domínio Fc. A descrição inclui um domínio Fc, em que os dois monômeros de domínio Fc do domínio Fc incluem mutações idênticas em pelo menos duas posições dentro do anel de resíduos carregados na interface entre os domínios constantes de anticorpo C_H3. A descrição também inclui um método de produção desse domínio Fc, incluindo a introdução de módulos de seletividade de dimerização complementares tendo mutações idênticas em duas sequências do monômero de domínio Fc em pelo menos duas posições dentro do anel de resíduos carregados na interface entre os domínios constantes de anticorpo C_H3. A interface entre os domínios constantes de anticorpo C_H3 consiste em uma porção hidrofóbica rodeada por um anel de resíduos carregados. Quando um domínio constante de anticorpo C_H3 vem junto de outro, esses resíduos carregados pareiam com resíduos da carga oposta. Ao inverter a carga de ambos os membros de dois ou mais pares complementares de resíduos, os monômeros de domínio Fc mutantes permanecem complementares aos monômeros de domínio Fc da mesma sequência mutante, mas têm complementariedade mais baixa aos monômeros de domínio Fc sem essas mutações. Nesta

modalidade, os módulos de seletividade de dimerização idênticos promovem a homodimerização. Esses domínios Fc incluem monômeros de domínio Fc contendo as mutações duplas K409D/D399K, K392D/D399K, E357K/K370E, D356K/K439D, K409E/D399K, K392E/D399K, E357K/K370D, ou D356K/K439E. Em outra modalidade, um domínio Fc inclui monômeros de domínio Fc incluindo mutantes quádruplos que combinam qualquer par de mutantes duplos, por exemplo, K409D/D399K/E357K/K370E.

[0095] Em outra modalidade, além dos módulos de seletividade de dimerização idênticos, os monômeros de domínio Fc do domínio Fc incluem módulos de seletividade de dimerização complementares tendo mutações não idênticas que promovem associação específica (por exemplo, cavidade e protuberância manipuladas). Como resultado, os dois monômeros de domínio Fc incluem dois módulos de seletividade de dimerização e permanecem complementares entre si, mas têm uma menor complementariedade a outros monômeros de domínio Fc. Esta modalidade promove a heterodimerização entre um domínio Fc contendo uma cavidade e um monômero de domínio Fc contendo uma protuberância. Em um exemplo, os módulos de seletividade de dimerização complementares tendo mutações não idênticas em resíduos de par carregado de ambos os monômeros de domínio Fc são combinados com uma protuberância em um monômero de domínio Fc e uma cavidade no outro monômero de domínio Fc.

[0096] Em qualquer um dos construtos de Fc descritos neste documento, entende-se que a ordem dos monômeros de domínio Fc seja intercambiável. Por exemplo, em um polipeptídeo com um primeiro monômero de domínio Fc conectado a um segundo monômero de domínio Fc por um peptídeo de ligação, o terminal carbóxi do primeiro monômero de domínio Fc pode ser unido ao terminal amino do peptídeo de ligação que, por sua vez, é unido em seu terminal carbóxi ao

terminal amino do segundo monômero de domínio Fc. Alternativamente, o terminal carbóxi do segundo monômero de domínio Fc pode ser unido ao terminal amino do peptídeo de ligação que, por sua vez, é unido em seu terminal carbóxi ao terminal amino do primeiro monômero de domínio. Ambas as configurações são englobadas pela descrição.

Definições:

[0097] Conforme usado neste documento, o termo "monômero de domínio Fc" refere-se a uma cadeia polipeptídica que inclui pelo menos um domínio dobradiça (ou porção do mesmo) e um segundo e terceiro domínios constantes de anticorpo ($C_{H}2$ e $C_{H}3$) ou seus fragmentos funcionais (por exemplo, fragmentos que são capazes de (i) dimerizar com outro monômero de domínio Fc para formar um domínio Fc, e (ii) se ligar a um receptor Fc). O monômero de domínio Fc pode ser de diferentes origens, por exemplo, humana, de camundongo, ou de rato. O monômero de domínio Fc pode ser qualquer isotipo de anticorpo imunoglobulina, incluindo IgG, IgE, IgM, IgA, ou IgD (por exemplo, IgG). Adicionalmente, o monômero de domínio Fc pode ser um subtipo de IgG (por exemplo, IgG1, IgG2a, IgG2b, IgG3, ou IgG4) (por exemplo, IgG1). Um monômero de domínio Fc não inclui nenhuma porção de uma imunoglobulina que seja capaz de atuar como uma região de reconhecimento de antígeno, por exemplo, um domínio variável ou uma região determinante de complementariedade (CDR). Os monômeros de domínio Fc podem conter mesmo dez alterações (por exemplo, modificações de aminoácidos únicos) de uma sequência de monômero de domínio Fc do tipo selvagem (por exemplo, 1-10, 1-8, 1-6, 1-4 substituições, adições ou deleções de aminoácidos) que podem alterar a interação entre um domínio Fc e um receptor Fc. Exemplos de alterações adequadas são conhecidos na técnica.

[0098] Conforme usado neste documento, o termo "domínio Fc"

refere-se a um dímero de dois monômeros de domínio Fc que são capazes de se ligar a um receptor Fc. No domínio Fc do tipo selvagem, os dois monômeros de domínio Fc se dimerizam pela interação entre os dois domínios constantes de anticorpo C_H3, bem como por uma ou mais ligações dissulfeto que se formam entre os domínios dobradiça dos dois monômeros de domínio Fc dimerizantes.

[0099] Na presente descrição, o termo "construto de Fc" refere-se a cadeias polipeptídicas associadas que foram domínios Fc conforme descrito neste documento (por exemplo, um construto de Fc tendo três domínios Fc). Os construtos de Fc descritos neste documento podem incluir monômeros de domínio Fc que têm sequências iguais ou diferentes. Por exemplo, um construto de Fc pode ter três domínios Fc, dois dos quais incluem IgG1 ou monômeros de domínio Fc derivados de IgG1, e um terceiro que inclui IgG2 ou monômeros de domínio Fc derivados de IgG2. Em outro exemplo, um construto de Fc pode ter três domínios Fc, dois dos quais compreendem um "par de protuberância-em-cavidade" e um terceiro que não compreende um "par de protuberância-em-cavidade". Na presente descrição, um domínio Fc não inclui uma região variável de um anticorpo, por exemplo, V_H, V_L, CDR, ou HVR. Um domínio Fc forma a estrutura mínima que se liga a um receptor Fc, por exemplo, FcγRI, FcγRIIa, FcγRIIb, FcγRIIIa, FcγRIIIb, FcγRIV. Em algumas modalidades, os construtos de Fc descritos neste documento não incluem uma região de reconhecimento de antígeno, por exemplo, um domínio variável ou uma região determinante de complementariedade (CDR). Em algumas modalidades, os construtos de Fc descritos neste documento incluem uma região de reconhecimento de antígeno, por exemplo, um domínio variável ou uma CDR.

[00100] Conforme usado neste documento, o termo "domínio constante de anticorpo" refere-se a um polipeptídeo que corresponde a um

domínio de região constante de um anticorpo (por exemplo, um domínio constante de anticorpo C_L, um domínio constante de anticorpo C_{H1}, um domínio constante de anticorpo C_{H2}, ou um domínio constante de anticorpo C_{H3}).

[00101] Conforme usado neste documento, o termo "promover" significa estimular e favorecer, por exemplo, favorecer a formação de um domínio Fc a partir de dois monômeros de domínio Fc que tenham maior afinidade de ligação entre si do que por outros monômeros de domínio Fc distintos. Conforme descrito neste documento, dois monômeros de domínio Fc que se combinam para formar um domínio Fc podem ter modificações de aminoácido compatíveis (por exemplo, protuberâncias manipuladas e cavidades manipuladas) na interface de seus respectivos domínios constantes de anticorpo C_{H3}. As modificações de aminoácido compatíveis promovem ou favorecem a interação seletiva desses monômeros de domínio Fc entre si em relação a outros monômeros de domínio Fc que não possuem essas modificações de aminoácido ou que possuam modificações de aminoácido incompatíveis. Isto ocorre porque, devido às modificações de aminoácido na interface dos dois domínios constantes de anticorpo C_{H3} interativos, os monômeros de domínio Fc têm uma maior afinidade entre si do que em relação a outros monômeros de domínio Fc que não possuem modificações de aminoácido.

[00102] Conforme usado neste documento, o termo "módulo de seletividade de dimerização" refere-se a uma sequência do monômero de domínio Fc que facilita o pareamento favorizado entre dois monômeros de domínio Fc. Módulos de seletividade de dimerização "complementares" são módulos de seletividade de dimerização que promovem ou favorecem a interação de dois monômeros de domínio Fc entre si. Módulos de seletividade de dimerização complementares podem ter sequências iguais ou diferentes. Módulos de seletividade de

dimerização complementares exemplares são descritos neste documento.

[00103] Conforme usado neste documento, o termo "cavidade manipulada" refere-se à substituição de pelo menos um dos resíduos de aminoácido originais no domínio constante de anticorpo C_H3 por um resíduo de aminoácido diferente tendo um volume de cadeia lateral menor do que o resíduo de aminoácido original, criando, assim, uma cavidade tridimensional no domínio constante de anticorpo C_H3. O termo "resíduo de aminoácido original" refere-se a um resíduo de aminoácido de ocorrência natural codificado pelo código genético de um domínio constante de anticorpo C_H3 do tipo selvagem.

[00104] Conforme usado neste documento, o termo "protuberância manipulada" refere-se à substituição de pelo menos um dos resíduos de aminoácido originais no domínio constante de anticorpo C_H3 por um resíduo de aminoácido diferente tendo um volume de cadeia lateral maior do que o resíduo de aminoácido original, criando, assim, uma protuberância tridimensional no domínio constante de anticorpo C_H3. O termo "resíduos de aminoácido originais" refere-se a resíduos de aminoácido de ocorrência natural codificados pelo código genético de um domínio constante de anticorpo C_H3 do tipo selvagem.

[00105] Conforme usado neste documento, o termo "par de protuberância-em-cavidade" descreve um domínio Fc que inclui dois monômeros de domínio Fc, em que o primeiro monômero de domínio Fc inclui uma cavidade manipulada em seu domínio constante de anticorpo C_H3, enquanto o segundo monômero de domínio Fc inclui uma protuberância manipulada em seu domínio constante de anticorpo C_H3. Em um par de protuberância-em-cavidade, a protuberância manipulada no domínio constante de anticorpo C_H3 do primeiro monômero de domínio Fc é posicionada de modo que interaja com a cavidade manipulada do domínio constante de anticorpo C_H3 do segundo monômero

de domínio Fc sem perturbar significativamente a associação normal do dímero na interface de domínio constante de anticorpo inter-C_H3.

[00106] Conforme usado neste documento, o termo "domínio Fc heterodimérico" refere-se a um domínio Fc que é formado pela heterodimerização de dois monômeros de domínio Fc, em que os dois monômeros de domínio Fc contêm mutações de carga inversa diferentes (vide, por exemplo, mutações na Tabela 2A) que promovem a formação favorável desses monômeros de domínio Fc. Conforme mostrado nas FIGURAS 1 e 2, em um construto de Fc tendo três domínios Fc - um domínio Fc em "haste" carboxila terminal e dois domínios Fc "ramificados" amino terminais - cada um dos domínios Fc "ramificados" amino terminais pode ser um domínio Fc heterodimérico (também chamado de "domínio Fc heterodimérico ramificado") (por exemplo, um domínio Fc heterodimérico formado pelos monômeros de domínio Fc 106 e 114 ou monômeros de domínio Fc 112 e 116 na FIG. 1; um domínio Fc heterodimérico formado pelos monômeros de domínio Fc 206 e 214 ou monômeros de domínio Fc 212 e 216 na FIG. 2).

[00107] Conforme usado neste documento, o termo "domínio Fc homodimérico" refere-se a um domínio Fc que é formado pela homodimerização de dois monômeros de domínio Fc, em que os dois monômeros de domínio Fc contêm as mesmas mutações de carga inversa (vide, por exemplo, mutações nas Tabelas 2B e 2C). Conforme mostrado nas FIGURAS 1 e 2, em um construto de Fc tendo três domínios Fc - um domínio Fc em "haste" carboxila terminal e dois domínios Fc "ramificados" amino terminais - o domínio Fc em "haste" carbóxi terminal pode ser um domínio Fc homodimérico (também chamado de "domínio Fc homodimérico em haste") (por exemplo, um domínio Fc homodimérico formado pelos monômeros de domínio Fc 104 e 110 na FIG. 1; um domínio Fc homodimérico formado pelos monômeros de domínio Fc 204 e 210 na FIG. 2).

[00108] Conforme usado neste documento, o termo "módulo de seletividade de heterodimerização" refere-se a protuberâncias manipuladas, cavidades manipuladas, e certas substituições de aminoácido de carga inversa que podem ser feitas nos domínios constantes de anticorpo C_H3 dos monômeros de domínio Fc a fim de promover a heterodimerização favorável de dois monômeros de domínio Fc que tenham módulos de seletividade de heterodimerização compatíveis. Os monômeros de domínio Fc contendo módulos de seletividade de heterodimerização podem ser combinar para formar um domínio Fc heterodimérico. Exemplos de módulos de seletividade de heterodimerização são mostrados na Tabela 1 e 2A.

[00109] Conforme usado neste documento, o termo "módulo de seletividade de homodimerização" refere-se a mutações de carga inversa em um monômero de domínio Fc em pelo menos duas posições dentro do anel de resíduos carregados na interface dentre domínios C_H3 que promovem a homodimerização do monômero de domínio Fc para formar um domínio Fc. Exemplos de módulos de seletividade de homodimerização são mostrados nas Tabelas 2A e 2B.

[00110] Conforme usado neste documento, o termo "unido" é usado para descrever a combinação ou a ligação de dois ou mais elementos, componentes, ou domínios proteicos, por exemplo, polipeptídeos, por meios, incluindo conjugação química, meios recombinantes e ligações químicas, por exemplo, ligações dissulfeto e ligações amida. Por exemplo, dois polipeptídeos únicos podem ser unidos para formar uma estrutura proteica contígua através de conjugação química, uma ligação química, um peptídeo de ligação, ou quaisquer outros meios de ligação covalente. Em algumas modalidades, um primeiro monômero de domínio Fc é unido a um segundo monômero de domínio Fc por meio de um peptídeo de ligação, em que o terminal N do peptídeo de ligação é unido ao terminal C do primeiro monômero de domínio Fc

através de uma ligação química, por exemplo, uma ligação peptídica, e o terminal C do peptídeo de ligação é unido ao terminal N do segundo monômero de domínio Fc através de uma ligação química, por exemplo, uma ligação peptídica. Em outras modalidades, o terminal N de um peptídeo de ligação à albumina é unido ao terminal C do domínio constante de anticorpo CH3 de um monômero de domínio Fc por meio de um peptídeo de ligação da mesma forma conforme mencionado acima.

[00111] Conforme usado neste documento, o termo "associado" é usado para descrever a interação, por exemplo, ligação de hidrogênio, interação hidrofóbica, ou interação iônica, entre polipeptídeos (ou sequências dentro de um único polipeptídeo) de modo que os polipeptídeos (ou sequências dentro de um único polipeptídeo) sejam posicionados para formar um construto de Fc descrito neste documento (por exemplo, um construto de Fc tendo três domínios Fc). Por exemplo, em algumas modalidades, quatro polipeptídeos, por exemplo, dois polipeptídeos incluindo, cada um, dois monômeros de domínio Fc, e dois polipeptídeos incluindo, cada um, um monômero de domínio Fc se associam para formar um construto de Fc que tem três domínios Fc (por exemplo, conforme descrito na FIGURAS 1 e 2). Os quatro polipeptídeos podem se associar através de seus respectivos monômeros de domínio Fc. A associação entre polipeptídeos não inclui interações covalentes.

[00112] Conforme usado neste documento, o termo "peptídeo de ligação" refere-se a uma ligação entre dois elementos, por exemplo, domínios proteicos. Um peptídeo de ligação pode ser uma ligação covalente ou um espaçador. O termo "ligação" refere-se a uma ligação química, por exemplo, uma ligação amida ou uma ligação dissulfeto, ou qualquer tipo de ligação criada a partir de uma reação química, por exemplo, conjugação química. O termo "espaçador" refere-se a uma

fração (por exemplo, um polímero de polietilenoglicol (PEG)) ou uma sequência de aminoácidos (por exemplo, uma sequência de 3-200 aminoácidos, 3-150 aminoácidos, 3-100 aminoácidos, 3-60 aminoácidos, 3-50 aminoácidos, 3-40 aminoácidos, 3-30 aminoácidos, 3-20 aminoácidos, 3-10 aminoácidos, 3-8 aminoácidos, 3-5 aminoácidos, 4-30 aminoácidos, 5-30 aminoácidos, 6-30 aminoácidos, 8-30 aminoácidos, 10-20 aminoácidos, 10-30 aminoácidos, 12-30 aminoácidos, 14-30 aminoácidos, 20-30 aminoácidos, 15-25 aminoácidos, 15-30 aminoácidos, 18-22 aminoácidos e 20-30 aminoácidos) ocorrendo entre dois polipeptídeos ou domínios polipeptídicos para fornecer espaço e/ou flexibilidade entre os dois polipeptídeos ou domínios polipeptídicos. Um espaçador de aminoácidos é parte da sequência primária de um polipeptídeo (por exemplo, unido aos polipeptídeos espaçados ou domínios polipeptídicos através da estrutura principal do polipeptídeo). A formação de ligações dissulfeto, por exemplo, entre duas regiões de dobradiça ou dois monômeros de domínio Fc que formam um domínio Fc, não é considerada um peptídeo de ligação.

[00113] Conforme usado neste documento, o termo "espaçador de glicina" refere-se a um peptídeo de ligação contendo apenas glicinas que unem dois monômeros de domínio Fc em série tandem. Um espaçador de glicina pode conter pelo menos 4, 8, 12, 14, 16, 18, ou 20 glicinas (por exemplo, 4-30, 8-30, 12-30, 12-50, 12-100, ou 12-200 glicinas; por exemplo, 12-30, 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, ou 30 glicinas). Em algumas modalidades, um espaçador de glicina compreende, consiste, ou consiste essencialmente na sequência GGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGG (SEQ ID NO: 27).

[00114] Conforme usado neste documento, o termo "peptídeo de ligação à albumina" refere-se a uma sequência de aminoácidos de 12 a 16 aminoácidos que tem afinidade por e funciona para ligar a albu-

mina sérica. Um peptídeo de ligação à albumina pode ser de diferentes origens, por exemplo, humana, de camundongo, ou de rato. Em algumas modalidades da presente descrição, um peptídeo de ligação à albumina é fundido ao terminal C de um monômero de domínio Fc para aumentar a meia-vida sérica do construto de Fc. Um peptídeo de ligação à albumina pode ser fundido, diretamente ou através de um peptídeo de ligação, ao terminal N ou C de um monômero de domínio Fc.

[00115] Conforme usado neste documento, o termo "peptídeo de purificação" refere-se a um peptídeo de qualquer comprimento que pode ser usado para purificação, isolamento, ou identificação de um polipeptídeo. Um peptídeo de purificação pode ser unido a um polipeptídeo para auxiliar na purificação do polipeptídeo e/ou isolamento do polipeptídeo, por exemplo, de uma mistura de lisado celular. Em algumas modalidades, o peptídeo de purificação se liga a outra fração que tenha uma afinidade específica pelo peptídeo de purificação. Em algumas modalidades, essas frações que se ligam especificamente ao peptídeo de purificação estão ligadas a um suporte sólido, tal como uma matriz, uma resina, ou esferas de agarose. Exemplos de peptídeo de purificação que podem ser unidos a um construto de Fc são descritos em mais detalhes neste documento.

[00116] Conforme usado neste documento, o termo "multímero" refere-se a uma molécula que inclui pelo menos dois construtos de Fc associados descritos neste documento.

[00117] Conforme usado neste documento, o termo "região de reconhecimento de antígeno" refere-se às porções das cadeias leve e pesada de um anticorpo que são responsáveis pelo reconhecimento e ligação de um anticorpo a um antígeno. A região de reconhecimento de antígeno inclui os domínios variáveis das cadeias leve e pesada (Fab), que incluem as regiões determinante de complementariedade

(CDRs, por exemplo, CDR L1, CDR L2, CDR L3, CDR H1, CDR H2, e CDR H3) e regiões de framework (FRs).

[00118] Conforme usado neste documento, a frase "ativação de células imunes da resposta imune" refere-se a uma resposta imune que é induzida ou ativada pela ligação de um imunocomplexo ou de um construto de Fc a um receptor Fc γ (Fc γ R) (por exemplo, um Fc γ R de ativação, por exemplo, Fc γ RI, Fc γ RIIa, Fc γ RIIc, Fc γ RIIIa, ou Fc γ RIIIb) em uma célula (por exemplo, uma célula imunológica (por exemplo, um monócito)). Um imunocomplexo é um complexo de antígeno-anticorpo formado a partir da ligação de um anticorpo a um antígeno. Um imunocomplexo geralmente tem múltiplos domínios Fc, que agregam Fc γ Rs e inibem ou ativam processos celulares que desempenham papéis críticos na inflamação, infecção e outras doenças. Em algumas modalidades, os construtos de Fc da descrição são capazes de se ligar a Fc γ Rs e induzem a sinalização de Fc γ R (por exemplo, Fc γ RI, Fc γ RIIa, Fc γ RIIc, Fc γ RIIIa, ou Fc γ RIIIb) de ativação em células imunológicas (por exemplo, um monócito). A medição de certos eventos de sinalização a jusante, tais como a fosforilação por quinase (por exemplo, fosforilação por Syk) e o influxo de cálcio na célula expressadora de Fc γ R, pode ser usada para detectar a ativação de células imunes de uma resposta imune causada pela ligação de um imunocomplexo ou de um construto de Fc. Por exemplo, a ativação de células imunes da resposta imune é induzida se o nível de fosforilação por quinase (por exemplo, fosforilação por Syk) ou o nível de influxo de cálcio da célula for de pelo menos 5 vezes, por exemplo, 5-100 vezes (por exemplo, 5-100, 10-95, 15-90, 20-85, 25-80, 30-75, 35-70, 40-65, 45-60, ou 50-55 vezes; por exemplo, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 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, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, ou 100 vezes) maior que o nível de fosforilação por quinase (por exemplo, fosforilação por Syk) ou de influxo de cálcio da célula sem qualquer ativação pelo imunocomplexo ou pelo construto de Fc.

[00119] Conforme usado neste documento, o termo "fagocitose" refere-se a uma forma de endocitose, na qual uma célula, geralmente um fagócito (por exemplo, um monócito) engole outra célula, uma partícula, ou um patógeno (por exemplo, um micrório ou um parasita) para formar um fagossomo. No sistema imunológico, a fagocitose é um mecanismo principal usado para remover células doentes (por exemplo, uma célula cancerosa, uma célula infectada, ou uma célula morta), patógenos e debríis celulares. Uma célula que é visada para ser fagocitada por outra célula (por exemplo, um fagócito (por exemplo, um monócito)) é referida como uma célula alvo. Por exemplo, uma célula imunológica (por exemplo, um monócito) ativada pela ligação de um construto de Fc da descrição aos FcγRs (por exemplo, FcγRI, FcγRIIa, FcγRIIc, FcγRIIIa, ou FcγRIIIb) na célula imunológica pode fagocitar uma célula alvo, que pode ser uma célula cancerosa ou uma célula infectada em um sujeito.

[00120] Conforme usado neste documento, "aumentar" ou "aumento" da fagocitose de uma célula alvo refere-se ao aumento na fagocitose induzido pela ligação de construto de Fc da descrição aos FcγRs (por exemplo, FcγRI, FcγRIIa, FcγRIIc, FcγRIIIa, ou FcγRIIIb) em uma célula imunológica (por exemplo, um monócito) em relação ao nível de fagocitose que ocorre sem a indução pelo construto de Fc. Por exemplo, a fagocitose de uma célula alvo é aumentada se o nível de fagocitose for pelo menos 10%, por exemplo, 10-100% (por exemplo, 10-100%, 15-95%, 20-90%, 25-85%, 30-80%, 35-75%, 40-70%, 45-65%, ou 50-60%; por exemplo, 10%, 11%, 12%, 13%, 14%, 15%, 16%,

17%, 18%, 19%, 20%, 21%, 22%, 23%, 24%, 25%, 26%, 27%, 28%, 29%, 30%, 31%, 32%, 33%, 34%, 35%, 36%, 37%, 38%, 39%, 40%, 41%, 42%, 43%, 44%, 45%, 46%, 47%, 48%, 49%, 50%, 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%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, ou 100%) maior que o nível de fagocitose que ocorre sem a indução pelo construto de Fc.

[00121] Conforme usado neste documento, o termo "tratamento de câncer" refere-se a um tratamento terapêutico de câncer em um sujeito. Um tratamento terapêutico retarda a progressão do câncer, melhora do desfecho do sujeito, e/ou elimina o câncer.

[00122] Conforme usado neste documento, o termo "tratamento de uma infecção" refere-se a um tratamento terapêutico de uma infecção em um sujeito. Um tratamento terapêutico retarda a progressão da infecção, melhora do desfecho do sujeito, e/ou elimina a infecção.

[00123] Conforme usado neste documento, o termo "infecção" refere-se à invasão de células, tecidos e/ou órgãos de um sujeito por um patógeno, tal como bactérias, vírus, fungos, helmintos, protozoários, artrópodes, e outros micróbios, parasitas e vermes. Em algumas modalidades, o patógeno pode crescer, se multiplicar e/ou produzir toxinas nas células, tecidos e/ou órgãos do sujeito. Em algumas modalidades, o sujeito pode desenvolver uma reação negativa (isto é, uma reação alérgica ou uma resposta imune) ao patógeno. Exemplos de infecções incluem, mas não estão limitados a, uma infecção bacteriana, uma infecção viral, uma infecção fúngica, uma infecção helmíntica, e uma infecção protozoária.

[00124] Conforme usado neste documento, o termo "infecção bacteriana" refere-se a uma infecção causada por uma ou mais bactérias.

Exemplos de bactérias causadoras de infecção são bem conhecidos na técnica e incluem, mas não estão limitados a, bactérias no gênero *Streptococcus* (por exemplo, *Streptococcus pyogenes*), bactérias no gênero *Escherichia* (por exemplo, *Escherichia coli*), bactérias no gênero *Vibrio* (por exemplo, *Vibrio cholerae*), bactérias no gênero *Enteritis* (por exemplo, *Enteritis salmonella*), bactérias no gênero *Salmonella* (por exemplo, *Salmonella typhi*).

[00125] Conforme usado neste documento, o termo "infecção viral" refere-se a uma infecção causada por um ou mais vírus. Exemplo de vírus causadores de infecção são bem conhecidos na técnicas e incluem, mas não estão limitados a, vírus na família Retroviridae (por exemplo, vírus da imunodeficiência humana (HIV)), vírus na família Adenoviridae (por exemplo, adenovírus), vírus na família Herpesviridae (por exemplo, vírus herpes simplex tipos 1 e 2), vírus na família Papilomaviridae (por exemplo, papilomavírus humano (HPV)), vírus na família Poxviridae (por exemplo, varíola), vírus na família Picornaviridae (por exemplo, vírus da hepatite A, poliovírus, rinovírus), vírus na família Hepadnaviridae (por exemplo, vírus da hepatite B), vírus na família Flaviviridae (por exemplo, vírus da hepatite C, vírus da febre amarela, vírus do Nilo Ocidental), vírus na família Togaviridae (por exemplo, vírus da rubéola), vírus na família Orthomyxoviridae (por exemplo, vírus influenza), vírus na família Filoviridae (por exemplo, vírus ebola, vírus de Marburg), e vírus na família Paramyxoviridae (por exemplo, vírus do sarampo, vírus da caxumba).

[00126] Conforme usado neste documento, o termo "infecção fúngica" refere-se a uma infecção causada por um ou mais fungos. Exemplos de fungos causadores de infecção são bem conhecidos na técnica e incluem, mas não estão limitados a, fungos no gênero *Aspergillus* (por exemplo, *Aspergillus fumigatus*, *A. flavus*, *A. terreus*, *A. niger*, *A. candidus*, *A. clavatus*, *A. ochraceus*), fungos no gênero *Candida* (por

exemplo, *Candida albicans*, *C. parapsilosis*, *C. glabrata*, *C. guilliermondii*, *C. krusei*, *C. lusitaniae*, *C. tropicalis*), fungos no gênero *Cryptococcus* (por exemplo, *Cryptococcus neoformans*), e fungos no gênero *Fusarium* (por exemplo, *Fusarium solani*, *F. verticillioides*, *F. oxysporum*).

[00127] Conforme usado neste documento, o termo "infecção helmíntica" refere-se a uma infecção causada por um ou mais helminhos. Exemplos de helmintos incluem, mas não estão limitados a, platelmintos (cestódeos), nematelmintos (nematódeos), fasciolídeos (trematódeos) e monogeneanos.

[00128] Conforme usado neste documento, o termo "infecção protozoária" refere-se a uma infecção causada por um ou mais protozoários. Exemplos de protozoários incluem, mas não estão limitados a, protozoários no gênero *Entamoeba* (por exemplo, *Entamoeba histolytica*), protozoários no gênero *Plasmodium* (por exemplo, *Plasmodium falciparum*, *P. malariae*), protozoários no gênero *Giardia* (por exemplo, *Giardia lamblia*), e protozoários no gênero *Trypanosoma* (por exemplo, *Trypanosoma brucei*).

[00129] Conforme usado neste documento, o termo "polinucleotídeo" refere-se a um oligonucleotídeo, ou nucleotídeo, e fragmentos ou porções dos mesmos, e ao DNA ou RNA de origem genômica ou sintética, que pode ser de fita simples ou dupla, e representa a fita sense ou anti-sense. Um único polinucleotídeo é traduzido em um único polipeptídeo.

[00130] Conforme usado neste documento, o termo "polipeptídeo" descreve um polímero único em que os monômeros são resíduos de aminoácidos que estão unidos através de ligações amida. Pretende-se que um polipeptídeo abranja qualquer sequência de aminoácidos, seja de ocorrência natural, recombinante ou produzida sinteticamente.

[00131] Conforme usado neste documento, o termo "posições de

"aminoácido" refere-se aos números de posição de aminoácidos em uma proteína ou domínio proteico. As posições de aminoácido para anticorpo ou construtos de Fc são numeradas usando a numeração de Kabat (Kabat et al., *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, National Institutes of Health, Bethesda, Md., ed 5, 1991).

[00132] Como usados neste documento, os termos "mutação de aminoácidos", "troca de aminoácidos" e "modificação de aminoácido" são usados permutavelmente para se referir a uma alteração de um polipeptídeo de domínio Fc quando comparado a um polipeptídeo de domínio Fc de referência (por exemplo, uma sequência Fc de tipo selvagem, não mutante ou sem modificações). O polipeptídeo de domínio Fc de referência pode ser polipeptídeo de domínio Fc de IgG1 humana de tipo selvagem. Uma modificação de aminoácido inclui substituições, deleções e/ou inserções de aminoácidos. Em algumas modalidades, uma modificação de aminoácido é a modificação de aminoácido único. Em outra modalidade, a modificação de aminoácido é a modificação de múltiplos (por exemplo, mais de um) aminoácidos. A modificação de aminoácidos pode compreender uma combinação de substituições, deleções e/ou inserções de aminoácidos. Incluídas na descrição de modificações de aminoácidos, estão alterações genéticas (isto é, DNA e RNA), tais como mutações pontuais (por exemplo, a troca de um único nucleotídeo por outro), inserções e deleções (por exemplo, a adição e/ou remoção de um ou mais nucleotídeos) da sequência nucleotídica que codifica um polipeptídeo Fc. Uma inserção, a menos que indicado em contrário, é uma adição de um ou mais aminoácidos diretamente após a posição de aminoácido na qual a inserção é especificada. A modificação de aminoácidos, por exemplo, uma substituição, inserção e/ou exclusão, a menos que indicado em contrária, é incorporada em ambos os monômeros de domínio Fc que compõem um domínio Fc. Em outras modalidades, um domínio Fc com

um primeiro e um segundo monômero de domínio Fc pode incluir, por exemplo, uma ou mais (por exemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 ou mais) modificações de aminoácido no primeiro monômero de domínio Fc que são diferentes de uma ou mais (por exemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 ou mais) modificações de aminoácido no segundo monômero de domínio Fc. Em algumas modalidades, um domínio Fc pode incluir monômeros de domínio Fc, por exemplo, um primeiro e um segundo monômero de domínio Fc, com modificações homogêneas de aminoácidos, por exemplo, na posição de aminoácido I253 e/ou R292. Em outras modalidades, um domínio Fc pode incluir monômeros de domínio Fc, por exemplo, um primeiro e um segundo monômero de domínio Fc, com modificações de aminoácidos heterogêneas, por exemplo, na posição de aminoácido I253 e/ou R292. Em certas modalidades, pelo menos um (por exemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 ou mais) domínio Fc dentro de um construto de Fc inclui uma modificação de aminoácido. Em alguns casos, o pelo menos um domínio Fc inclui uma ou mais (por exemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 ou mais) modificações de aminoácidos únicos. Em alguns casos, o domínio Fc inclui não mais do que dezesseis modificações de aminoácidos únicos (por exemplo, não mais de uma, duas, três, quatro, cinco, seis, sete, oito, nove, dez, onze, doze, treze, quatorze, quinze ou dezesseis modificações de aminoácidos). Em alguns casos, o monômero de domínio Fc inclui não mais que dez modificações de aminoácidos únicos. Em alguns casos, o monômero de domínio Fc inclui não mais que 12 modificações de aminoácidos únicos. Em alguns casos, o monômero de domínio Fc inclui não mais que 14 modificações de aminoácidos únicos.

[00133] Em certas modalidades, pelo menos um (por exemplo, um, dois ou três) domínio Fc dentro de um construto de Fc inclui uma modificação de aminoácido. Em alguns casos, o pelo menos um domínio Fc inclui uma ou mais (por exemplo, duas, três, quatro, cinco, seis, se-

te, oito, nove, dez, ou vinte ou mais) modificações de aminoácido. Em alguns casos, o pelo menos um monômero de domínio Fc inclui não mais que dez modificações de aminoácidos únicos.

[00134] Conforme usado neste documento, o termo "identidade percentual (%)" refere-se à porcentagem de resíduos de aminoácido (ou ácido nucleico) de uma sequência candidata, por exemplo, a sequência de um monômero de domínio Fc em um construto de Fc descrito neste documento que é idêntica aos resíduos de aminoácido (ou ácido nucleico) de uma sequência de referência, por exemplo, a sequência de um monômero de domínio Fc do tipo selvagem, após o alinhamento das sequências e da introdução de gaps, se necessário, para se obter a identidade percentual máxima (isto é, gaps podem ser introduzidos em uma ou em ambas as sequências candidata e de referência para um alinhamento ideal e sequência não homólogas podem ser desconsideradas para fins de comparação). O alinhamento para fins de determinação da identidade percentual pode ser obtido de diversas formas que estejam dentro da técnica, por exemplo, usando softwares de computador disponíveis publicamente, tais como software BLAST, ALIGN, ou Megalign (DNASTAR). Os versados na técnica podem determinar os parâmetros apropriados para a medição do alinhamento, incluindo quaisquer algoritmos necessários para se obter o alinhamento máximo sobre o comprimento total das sequências sendo comparadas. Em algumas modalidades, a identidade de sequência de aminoácidos (ou ácido nucleico) percentual de uma dada sequência candidata para, com ou contra uma dada sequência de referência (que pode ser alternativamente fraseada como uma dada sequência candidata que tenha ou inclua uma certa identidade de sequência de aminoácidos (ou ácido nucleico) percentual para, com ou contra uma dada sequência de referência) é calculada como se segue:

$$100 \times (\text{fração de A/B})$$

onde A é o número de resíduos de aminoácido (ou ácido nucleico) marcados como idênticos no alinhamento da sequência candidata e da sequência de referência, e onde B é o número total de resíduos de aminoácidos (ou ácido nucleico) na sequência de referência. Em algumas modalidades onde o comprimento da sequência candidata não é igual ao comprimento da sequência de referência, a identidade de sequência percentual de aminoácidos (ou ácido nucleico) da sequência candidata para a sequência de referência não seria igual à identidade de sequência percentual de aminoácidos (ou ácido nucleico) da sequência de referência para a sequência candidata.

[00135] Em modalidades específicas, uma sequência de referência alinhada para comparação com uma sequência candidata pode mostrar que a sequência candidata exibe de 50% a 100% de identidade (por exemplo, 50% a 100%, 60% a 100%, 70% a 100%, 80% a 100%, 90% a 100%, 92% a 100%, 95% a 100%, 97% a 100%, 99% a 100%, ou 99,5% a 100% de identidade), por todo o comprimento da sequência candidata ou de uma porção selecionada de resíduos de aminoácidos (ou ácido nucleico) contíguos da sequência candidata. O comprimento da sequência candidata alinhada para fins de comparação é pelo menos 30%, pelo menos 40%, pelo menos 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, ou 100% do comprimento da sequência de referência. Quando uma posição na sequência candidata estiver ocupada pelo menos resíduos de aminoácido (ou ácido nucleico) que a posição correspondente na sequência de referência, então as moléculas serão idênticas nessa posição.

[00136] Em algumas modalidades, um monômero de domínio Fc em um construto de Fc descrito neste documento (por exemplo, um construto de Fc tendo três domínios Fc) pode compreender, consistir em, ou consistir essencialmente em uma sequência que seja pelo menos 95% idêntica (por exemplo, pelo menos 97%, 99%, ou 99,5% idêntica).

tica) à sequência de um monômero de domínio Fc do tipo selvagem (por exemplo, SEQ ID NO: 42). Em algumas modalidades, um monômero de domínio Fc em um construto de Fc descrito neste documento (por exemplo, um construto de Fc tendo três domínios Fc) pode compreender, consistir em, ou consistir essencialmente em uma sequência que seja pelo menos 95% idêntica (por exemplo, pelo menos 97%, 99%, ou 99,5% idêntica) à sequência de qualquer uma das SEQ ID NOs: 44, 46, 48, e 50-53. Em certas modalidades, um monômero de domínio Fc no construto de Fc pode compreender, consistir em, ou consistir essencialmente em uma sequência que seja pelo menos 95% idêntica (por exemplo, pelo menos 97%, 99%, ou 99,5% idêntica) à sequência da SEQ ID NO: 48, 52, e 53.

[00137] Em alguns casos, um monômero de domínio Fc em um construto de Fc descrito neste documento pode compreender, consistir em, ou consistir essencialmente em uma sequência que seja pelo menos 95% idêntica (por exemplo, pelo menos 97%, 99%, ou 99,5% idêntica) a qualquer uma das sequências descritas neste documento. Em alguns casos, um monômero de domínio Fc em um construto de Fc descrito neste documento compreende, consiste em, ou consiste essencialmente em uma sequência que é qualquer uma das sequências descritas neste documento com até 10 (por exemplo, até 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 ou 1) modificações de aminoácidos únicos (por exemplo, substituições, por exemplo, substituições conservativas).

[00138] Em algumas modalidades, um polipeptídeo tendo dois monômeros de domínio Fc em um construto de Fc descrito neste documento (por exemplo, polipeptídeos 102 e 108 na FIG. 1; polipeptídeos 202 e 208 na FIG. 2) pode compreender, consistir em, ou consistir essencialmente em uma sequência que seja pelo menos 95% idêntica (por exemplo, pelo menos 97%, 99%, ou 99,5% idêntica) à sequência de qualquer uma das SEQ ID NOs: 43, 45, 47, e 49. Em certas moda-

lidades, um polipeptídeo tendo dois monômeros de domínio Fc em um construto de Fc descrito neste documento pode compreender, consistir em, ou consistir essencialmente em uma sequência que seja pelo menos 95% idêntica (por exemplo, pelo menos 97%, 99%, ou 99,5% idêntica) à sequência de SEQ ID NO: 49.

[00139] Em algumas modalidades, um espaçador entre dois monômeros de domínio Fc compreende, consiste em, ou consiste essencialmente em uma sequência que é pelo menos 75% idêntica (por exemplo, pelo menos, 75%, 77%, 79%, 81%, 83%, 85%, 87%, 89%, 91%, 93%, 95%, 97%, 99%, 99,5% ou 100% idêntica) à sequência de qualquer uma das SEQ ID NOs: 1-36 (por exemplo, SEQ ID NOs: 17, 18, 26, e 27) descritas posteriormente neste documento.

[00140] Conforme usado neste documento, o termo "célula hospedeira" refere-se a um veículo que inclui os componentes celulares necessários, por exemplo, organelas, necessários para expressar proteínas de seus ácidos nucleicos correspondentes. Os ácidos nucleicos são normalmente incluídos em vetores de ácido nucleico que podem ser introduzidos na célula hospedeira por técnicas convencionais conhecidas na técnica (transformação, transfecção, eletroporação, precipitação por fosfato de cálcio, microinjeção direta, etc.). Uma célula hospedeira pode ser uma célula procariótica, por exemplo, uma célula bacteriana, ou uma célula eucariótica, por exemplo, uma célula de mamífero (por exemplo, uma célula CHO). Conforme descrito neste documento, uma célula hospedeira é usada para expressar um ou mais polipeptídeos que codificam domínios desejados que podem então se combinar para formar um construto de Fc desejado.

[00141] Conforme usado neste documento, o termo "composição farmacêutica" refere-se a uma formulação medicinal ou farmacêutica que contém um ingrediente ativo bem como um ou mais excipientes e diluentes que permitam que o ingrediente ativo seja adequado para o

método de administração. A composição farmacêutica da presente descrição inclui componentes farmaceuticamente aceitáveis que sejam compatíveis com o construto de Fc. A composição farmacêutica está normalmente na forma aquosa para administração intravenosa ou subcutânea.

[00142] Conforme usado neste documento, uma "população substancialmente homogênea" de polipeptídeos ou de um construto de Fc é um no qual pelo menos 50% dos polipeptídeos ou construtos de Fc em uma composição (por exemplo, um meio de cultura celular ou uma composição farmacêutica) tem o mesmo número de domínios Fc, conforme determinado por eletroforese em gel de SDS não redutora ou cromatografia de exclusão por tamanho. Uma população substancialmente homogênea de polipeptídeos ou de um construto de Fc pode ser obtida antes da purificação, ou após a purificação da Proteína A ou Proteína G, ou após qualquer cromatografia de afinidade específica para Fab ou Fc apenas. Em várias modalidades, pelo menos 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, ou 85% dos polipeptídeos ou construtos de Fc na composição têm o mesmo número de domínios Fc. Em outras modalidades, até 85%, 90%, 92%, ou 95% dos polipeptídeos ou construtos de Fc na composição têm o mesmo número de domínios Fc. Uma população ou composição substancialmente homogênea é pelo menos 85% homogênea (por exemplo, pelo menos 85%, 90%, ou 95% homogênea).

[00143] Conforme usado neste documento, o termo "veículo farmaceuticamente aceitável" refere-se a um excipiente ou diluente em uma composição farmacêutica. O veículo farmaceuticamente aceitável deve ser compatível com os outros ingredientes da formulação e não prejudicial ao recebedor. Na presente descrição, o veículo farmaceuticamente aceitável deve fornecer estabilidade farmacêutica adequada ao construto de Fc. A natureza do veículo difere com o modo de adminis-

tração. Por exemplo, para administração oral, um veículo sólido é preferencial; para administração intravenosa, um veículo de solução aquosa (por exemplo, WFI e/ou uma solução tamponada) é geralmente usado.

[00144] Conforme usado neste documento, "quantidade terapeuticamente eficaz" refere-se a uma quantidade, por exemplo, dose farmacêutica, eficaz na indução de um efeito biológico desejado em um sujeito ou paciente ou no tratamento de um paciente com uma condição ou distúrbio descrito neste documento. Também é entendido neste documento que uma "quantidade terapeuticamente eficaz" pode ser interpretada como uma quantidade que proporciona um efeito terapêutico desejado, tanto tomada em uma dose quanto em qualquer dosagem ou via, tomada sozinha ou em combinação com outros agentes terapêuticos.

DESCRIÇÃO DOS DESENHOS

[00145] A FIG. 1 é uma ilustração de construtos de Fc (construto de Fc 1, construto de Fc 2, ou construto de Fc 3) contendo três domínios Fc formados por quatro polipeptídeos. O primeiro polipeptídeo (102) contém um monômero de domínio Fc (104) contendo diferentes aminoácidos carregados na interface C_H3-C_H3 em relação à sequência do monômero de domínio Fc do tipo selvagem unida em uma série tandem com um monômero de domínio Fc contendo uma protuberância (106). O segundo polipeptídeo (108) contém um monômero de domínio Fc (110) contendo diferentes aminoácidos carregados na interface C_H3-C_H3 em relação à sequência do monômero de domínio Fc do tipo selvagem unida em uma série tandem com um monômero de domínio Fc contendo uma protuberância (112). O terceiro e quarto polipeptídeos (114 e 116, respectivamente) contém, cada um, um monômero de domínio Fc contendo uma cavidade.

[00146] A FIG. 2 é uma ilustração de um construto de Fc (construto

de Fc 4) contendo três domínios Fc formados por quatro polipeptídeos. O primeiro polipeptídeo (202) contém um monômero de domínio Fc (204) contendo diferentes aminoácidos carregados na interface C_H3-C_H3 em relação à sequência do monômero de domínio Fc do tipo selvagem unida em uma série tandem com outro monômero de domínio Fc (206) contendo diferentes aminoácidos carregados e uma protuberância. O segundo polipeptídeo (208) contém um monômero de domínio Fc (210) contendo diferentes aminoácidos carregados na interface C_H3-C_H3 em relação à sequência do monômero de domínio Fc do tipo selvagem unida em uma série tandem com outro monômero de domínio Fc (212) contendo diferentes aminoácidos carregados e uma protuberância. O terceiro e quarto polipeptídeos (214 e 216, respectivamente) contém, cada um, um monômero de domínio Fc contendo diferentes aminoácidos carregados e uma cavidade.

[00147] A FIG. 3 mostra a identificação de Ser O-xilosilado no peptídeo de ligação do construto de Fc 2 (SGGGSGGGSGGGSGGGSGGG (SEQ ID NO: 18)) por LC-MS/MS.

[00148] A FIG. 4 mostra a abundância de O-xilosilação do peptídeo de ligação em um construto de Fc tendo dois domínios Fc (o construto de Fc mostrado na FIG. 13) conforme determinado por LC-MS/MS.

[00149] A FIG. 5 mostra a formação de espécies de Fc monoméricas a partir dos construtos de Fc 2 e 4 após o armazenamento a 45°C conforme determinado por CE-SDS.

[00150] A FIG. 6 mostra produtos da proteólise do construto de Fc 2 após duas semanas de armazenamento a 45°C conforme determinado por LC-MS.

[00151] A FIG. 7 mostra produtos da proteólise do construto de Fc 4 após duas semanas de armazenamento a 45°C conforme determinado por LC-MS.

[00152] A FIG. 8 mostra a inibição da liberação de IL-8 por células

THP-1 pelo construto de Fc 2 com comprimentos de peptídeo de ligação variáveis.

[00153] A FIG. 9 mostra a inibição do fluxo de cálcio em neutrófilos pelo construto de Fc 2 com comprimentos de peptídeo de ligação variáveis.

[00154] A FIG. 10 mostra a distribuição de tamanho por SDS-PAGE não redutor do construto de Fc 2 e construto de Fc 4 em meios não purificados.

[00155] A FIG. 11 mostra a expressão e montagem do construto de Fc 2 ("com orientação eletrostática") e outro construto de Fc tendo três domínios Fc mas sem mutações de orientação eletrostática nas subunidades em "haste" ("sem orientação eletrostática").

[00156] A FIG. 12 mostra que a remoção da lisina C-terminal para gerar o construto de Fc 2 não induziu a citotoxicidade dependendo do complemento (CDC) in vitro.

[00157] A FIG. 13 é uma ilustração de um construto de Fc contendo dois domínios Fc formados por três polipeptídeos.

[00158] A FIG. 14 é uma ilustração de um construto de Fc contendo cinco domínios Fc formados por seis polipeptídeos (Fc5X).

[00159] A FIG. 15 é uma ilustração de um construto de Fc contendo cinco domínios Fc formados por seis polipeptídeos (Fc5Y).

[00160] A FIG. 16 é uma ilustração de um construto de Fc contendo cinco domínios Fc formados por seis polipeptídeos (Fc5Y-invertido).

[00161] A FIG. 17 é uma ilustração de um construto de Fc contendo três domínios Fc formados por dois polipeptídeos.

[00162] A FIG. 18A é uma ilustração de um construto de Fc (construto 5) contendo três domínios Fc formados por quatro polipeptídeos. Cada um dentre o primeiro polipeptídeo (502) e o segundo polipeptídeo (508) contém um monômero de domínio Fc contendo aminoácidos carregados na interface C_H3-C_H3 em relação à sequência do tipo sel-

vagem (506 e 512, respectivamente) unida por meio de um peptídeo de ligação a um monômero de domínio Fc contendo uma protuberância (504 e 510, respectivamente). O terceiro e quarto polipeptídeos (514 e 516, respectivamente) contém, cada um, um monômero de domínio Fc contendo uma cavidade. Cada um dentre o primeiro polipeptídeo (502) e o segundo polipeptídeo (508) também contém mutações de direcionamento eletrostáticas, por exemplo, E357K. Da mesma forma, o terceiro e quarto polipeptídeos (514 e 516, respectivamente) contêm, cada um, mutações de direcionamento eletrostáticas, por exemplo, K370D. 506 e 512 contêm, cada um, a modificação de aminoácido I253A, que é representada como um asterisco. 502 e 508 têm, cada um, a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 62. 514 e 516 têm, cada um, a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 61.

[00163] A FIG. 18B é uma ilustração de um construto de Fc (construto 6) contendo três domínios Fc formados por quatro polipeptídeos. Cada um dentre o primeiro polipeptídeo (602) e o segundo polipeptídeo (608) contém um monômero de domínio Fc contendo aminoácidos carregados na interface C_H3-C_H3 em relação à sequência do tipo selvagem (606 e 612, respectivamente) unida por meio de um peptídeo de ligação a um monômero de domínio Fc contendo uma protuberância (604 e 610, respectivamente). O terceiro e quarto polipeptídeos (614 e 616, respectivamente) contém, cada um, um monômero de domínio Fc contendo uma cavidade. Cada um dentre o primeiro polipeptídeo (602) e o segundo polipeptídeo (608) também contém mutações de direcionamento eletrostáticas, por exemplo, E357K. Da mesma forma, o terceiro e quarto polipeptídeos (614 e 616, respectivamente) contêm, cada um, mutações de direcionamento eletrostáticas, por exemplo, K370D. 604, 610, 614 e 616 contêm, cada um, a modificação de aminoácido I253A, que é representada como um asterisco. 602 e 608 têm, cada um, a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:

64. 614 e 616 têm, cada um, a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 63.

[00164] A FIG. 18C é uma ilustração de um construto de Fc (construto 7) contendo três domínios Fc formados por quatro polipeptídeos. Cada um dentre o primeiro polipeptídeo (702) e o segundo polipeptídeo (708) contém um monômero de domínio Fc contendo aminoácidos carregados na interface C_H3-C_H3 em relação à sequência do tipo selvagem (706 e 712, respectivamente) unida por meio de um peptídeo de ligação a um monômero de domínio Fc contendo uma protuberância (704 e 710, respectivamente). O terceiro e quarto polipeptídeos (714 e 716, respectivamente) contém, cada um, um monômero de domínio Fc contendo uma cavidade. Cada um dentre o primeiro polipeptídeo (702) e o segundo polipeptídeo (708) também contém mutações de direcionamento eletrostáticas, por exemplo, E357K. Da mesma forma, o terceiro e quarto polipeptídeos (714 e 716, respectivamente) contêm, cada um, mutações de direcionamento eletrostáticas, por exemplo, K370D. 704, 706, 710, 712, 714, e 716 contêm, cada um, a modificação de aminoácido I253A, que é representada como um asterisco. 702 e 708 têm, cada um, a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 65. 714 e 716 têm, cada um, a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 63.

[00165] A FIG. 18D é uma ilustração de um construto de Fc (construto 8) contendo três domínios Fc formados por quatro polipeptídeos. Cada um dentre o primeiro polipeptídeo (802) e o segundo polipeptídeo (808) contém um monômero de domínio Fc contendo aminoácidos carregados na interface C_H3-C_H3 em relação à sequência do tipo selvagem (806 e 812, respectivamente) unida por meio de um peptídeo de ligação a um monômero de domínio Fc contendo uma protuberância (804 e 810, respectivamente). O terceiro e quarto polipeptídeos (814 e 816, respectivamente) contém, cada um, um monômero de do-

mínio Fc contendo uma cavidade. Cada um dentre o primeiro polipeptídeo (802) e o segundo polipeptídeo (808) também contém mutações de direcionamento eletrostáticas, por exemplo, E357K. Da mesma forma, o terceiro e quarto polipeptídeos (814 e 816, respectivamente) contêm, cada um, mutações de direcionamento eletrostáticas, por exemplo, K370D. 806 e 812 contêm, cada um, a modificação de aminoácido R292P, que é representada como um diamante. 802 e 808 têm, cada um, a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 66. 814 e 816 têm, cada um, a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 61.

[00166] A FIG. 18E é uma ilustração de um construto de Fc (construto 9) contendo três domínios Fc formados por quatro polipeptídeos. Cada um dentre o primeiro polipeptídeo (902) e o segundo polipeptídeo (908) contém um monômero de domínio Fc contendo aminoácidos carregados na interface C_H3-C_H3 em relação à sequência do tipo selvagem (906 e 912, respectivamente) unida por meio de um peptídeo de ligação a um monômero de domínio Fc contendo uma protuberância (904 e 910, respectivamente). O terceiro e quarto polipeptídeos (914 e 916, respectivamente) contêm, cada um, um monômero de domínio Fc contendo uma cavidade. Cada um dentre o primeiro polipeptídeo (902) e o segundo polipeptídeo (908) também contém mutações de direcionamento eletrostáticas, por exemplo, E357K. Da mesma forma, o terceiro e quarto polipeptídeos (914 e 916, respectivamente) contêm, cada um, mutações de direcionamento eletrostáticas, por exemplo, K370D. 906 e 912, cada um, contêm as modificações de aminoácido I253A, que é representado como um asterisco e R292P, que é representado como um diamante. 902 e 908 têm, cada um, a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 67. 914 e 916 têm, cada um, a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 61.

[00167] A FIG. 18F é uma ilustração de um construto de Fc (construto 10) contendo três domínios Fc formados por quatro polipeptídeos.

Cada um dentre o primeiro polipeptídeo (1002) e o segundo polipeptídeo (1008) contém um monômero de domínio Fc contendo aminoácidos carregados na interface C_H3-C_H3 em relação à sequência do tipo selvagem (1006 e 1012, respectivamente) unida por meio de um pep-tídeo de ligação a um monômero de domínio Fc contendo uma protuberância (1004 e 1010, respectivamente). O terceiro e quarto polipeptídeos (1014 e 1016, respectivamente) contém, cada um, um monômero de domínio Fc contendo uma cavidade. Cada um dentre o primeiro polipeptídeo (1002) e o segundo polipeptídeo (1008) também contém mutações de direcionamento eletrostáticas, por exemplo, E357K. Da mesma forma, o terceiro e quarto polipeptídeos (1014 e 1016, respectivamente) contêm, cada um, mutações de direcionamento eletrostáticas, por exemplo, K370D. 1006 e 1012 contêm, cada um, a modificação de aminoácido R292P, que é representada como um diamante, e 1004, 1010, 1014 e 1016 contêm, cada um, a modificação de aminoácido I253A, que é representada como um asterisco. 1002 e 1008 têm, cada um, a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 68. 1014 e 1016 têm, cada um, a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 63.

[00168] A FIG. 18G é uma ilustração de um construto de Fc (construto 11) contendo três domínios Fc formados por quatro polipeptídeos. Cada um dentre o primeiro polipeptídeo (1102) e o segundo polipeptídeo (1108) contém um monômero de domínio Fc contendo aminoácidos carregados na interface C_H3-C_H3 em relação à sequência do tipo selvagem (1106 e 1112, respectivamente) unida por meio de um pep-tídeo de ligação a um monômero de domínio Fc contendo uma protuberância (1104 e 1110, respectivamente). O terceiro e quarto polipeptídeos (1114 e 1116, respectivamente) contém, cada um, um monômero de domínio Fc contendo uma cavidade. Cada um dentre o primeiro polipeptídeo (1102) e o segundo polipeptídeo (1108) também contém mutações de direcionamento eletrostáticas, por exemplo, E357K. Da

mesma forma, o terceiro e quarto polipeptídeos (1114 e 1116, respectivamente) contêm, cada um, mutações de direcionamento eletrostáticas, por exemplo, K370D. 1106 e 1112 contêm, cada um, a modificação de aminoácido R292P, que é representada como um diamante, e 1104, 1110, 1114 e 1116 contêm, cada um, a modificação de aminoácido I253A, que é representada como um asterisco. 1102 e 1108 têm, cada um, a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 69. 1114 e 1116 têm, cada um, a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 63.

[00169] A FIG. 18H é uma ilustração de um construto de Fc (construto 12) contendo três domínios Fc formados por quatro polipeptídeos. Cada um dentre o primeiro polipeptídeo (1202) e o segundo polipeptídeo (1208) contém um monômero de domínio Fc contendo aminoácidos carregados na interface C_H3-C_H3 em relação à sequência do tipo selvagem (1206 e 1212, respectivamente) unida por meio de um peptídeo de ligação a um monômero de domínio Fc contendo uma protuberância (1204 e 1210, respectivamente). O terceiro e quarto polipeptídeos (1214 e 1216, respectivamente) contêm, cada um, um monômero de domínio Fc contendo uma cavidade. Cada um dentre o primeiro polipeptídeo (1202) e o segundo polipeptídeo (1208) também contém mutações de direcionamento eletrostáticas, por exemplo, E357K. Da mesma forma, o terceiro e quarto polipeptídeos (1214 e 1216, respectivamente) contêm, cada um, mutações de direcionamento eletrostáticas, por exemplo, K370D. 1204, 1210, 1214 e 1216 contêm, cada um, a modificação de aminoácido R292P, que é representada como um diamante. 1202 e 1208 têm, cada um, a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 71. 1214 e 1216 têm, cada um, a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 70.

[00170] A FIG. 18I é uma ilustração de um construto de Fc (construto 13) contendo três domínios Fc formados por quatro polipeptídeos. Cada um dentre o primeiro polipeptídeo (1302) e o segundo polipeptí-

deo (1308) contém um monômero de domínio Fc contendo aminoácidos carregados na interface C_H3-C_H3 em relação à sequência do tipo selvagem (1306 e 1312, respectivamente) unida por meio de um peptídeo de ligação a um monômero de domínio Fc contendo uma protuberância (1304 e 1310, respectivamente). O terceiro e quarto polipeptídeos (1314 e 1316, respectivamente) contém, cada um, um monômero de domínio Fc contendo uma cavidade. Cada um dentre o primeiro polipeptídeo (1302) e o segundo polipeptídeo (1308) também contém mutações de direcionamento eletrostáticas, por exemplo, E357K. Da mesma forma, o terceiro e quarto polipeptídeos (1314 e 1316, respectivamente) contêm, cada um, mutações de direcionamento eletrostáticas, por exemplo, K370D. 1304, 1310, 1314 e 1316 contêm, cada um, a modificação de aminoácido R292P, que é representada como um diamante, e 1306 e 1132 contêm, cada um, a modificação de aminoácido I253A, que é representada como um asterisco. 1302 e 1308 têm, cada um, a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 72. 1314 e 1316 têm, cada um, a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 70.

[00171] A FIG. 18J é uma ilustração de um construto de Fc (construto 14) contendo três domínios Fc formados por quatro polipeptídeos. Cada um dentre o primeiro polipeptídeo (1402) e o segundo polipeptídeo (1408) contém um monômero de domínio Fc contendo aminoácidos carregados na interface C_H3-C_H3 em relação à sequência do tipo selvagem (1406 e 1412, respectivamente) unida por meio de um peptídeo de ligação a um monômero de domínio Fc contendo uma protuberância (1404 e 1410, respectivamente). O terceiro e quarto polipeptídeos (1414 e 1416, respectivamente) contém, cada um, um monômero de domínio Fc contendo uma cavidade. Cada um dentre o primeiro polipeptídeo (1402) e o segundo polipeptídeo (1408) também contém mutações de direcionamento eletrostáticas, por exemplo, E357K. Da mesma forma, o terceiro e quarto polipeptídeos (1414 e 1416, respec-

tivamente) contêm, cada um, mutações de direcionamento eletrostáticas, por exemplo, K370D. 1404, 1410, 1414 e 1416 contêm, cada um, as modificações de aminoácido R292P, que é representado como um diamante, e I253A, que é representado como um asterisco. 1402 e 1408 têm, cada um, a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 74. 1414 e 1416 têm, cada um, a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 73.

[00172] A FIG. 18K é uma ilustração de um construto de Fc (construto 15) contendo três domínios Fc formados por quatro polipeptídeos. Cada um dentre o primeiro polipeptídeo (1502) e o segundo polipeptídeo (1508) contém um monômero de domínio Fc contendo aminoácidos carregados na interface C_H3-C_H3 em relação à sequência do tipo selvagem (1506 e 1512, respectivamente) unida por meio de um peptídeo de ligação a um monômero de domínio Fc contendo uma protuberância (1504 e 1510, respectivamente). O terceiro e quarto polipeptídeos (1514 e 1516, respectivamente) contém, cada um, um monômero de domínio Fc contendo uma cavidade. Cada um dentre o primeiro polipeptídeo (1502) e o segundo polipeptídeo (1508) também contém mutações de direcionamento eletrostáticas, por exemplo, E357K. Da mesma forma, o terceiro e quarto polipeptídeos (1514 e 1516, respectivamente) contêm, cada um, mutações de direcionamento eletrostáticas, por exemplo, K370D. 1504, 1510, 1514 e 1516 contêm, cada um, a modificação de aminoácido R292P, que é representada como um diamante, e 1506 e 1512 contêm, cada um, a modificação de aminoácido I253A, que é representada como um asterisco. 1502 e 1508 têm, cada um, a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 75. 1514 e 1516 têm, cada um, a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 73.

[00173] A FIG. 18L é uma ilustração de um construto de Fc (construto 16) contendo três domínios Fc formados por quatro polipeptídeos. Cada um dentre o primeiro polipeptídeo (1602) e o segundo polipeptí-

deo (1608) contém um monômero de domínio Fc contendo aminoácidos carregados na interface C_H3-C_H3 em relação à sequência do tipo selvagem (1606 e 1612, respectivamente) unida por meio de um pep-tídeo de ligação a um monômero de domínio Fc contendo uma protuberância (1604 e 1610, respectivamente). O terceiro e quarto polipeptídeos (1614 e 1616, respectivamente) contém, cada um, um monômero de domínio Fc contendo uma cavidade. Cada um dentre o primeiro polipeptídeo (1602) e o segundo polipeptídeo (1608) também contém mutações de direcionamento eletrostáticas, por exemplo, E357K. Da mesma forma, o terceiro e quarto polipeptídeos (1614 e 1616, respectivamente) contêm, cada um, mutações de direcionamento eletrostáticas, por exemplo, K370D. 1604, 1606, 1610, 1612, 1614 e 1616 contêm, cada um, a modificação de aminoácido R292P, que é representada por um diamante. 1602 e 1608 têm, cada um, a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 76. 1614 e 1616 têm, cada um, a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 70.

[00174] A FIG. 18M é uma ilustração de um construto de Fc (construto 17) contendo três domínios Fc formados por quatro polipeptídeos. Cada um dentre o primeiro polipeptídeo (1702) e o segundo polipeptídeo (1708) contém um monômero de domínio Fc contendo aminoácidos carregados na interface C_H3-C_H3 em relação à sequência do tipo selvagem (1706 e 1712, respectivamente) unida por meio de um pep-tídeo de ligação a um monômero de domínio Fc contendo uma protuberância (1704 e 1710, respectivamente). O terceiro e quarto polipeptídeos (1714 e 1716, respectivamente) contém, cada um, um monômero de domínio Fc contendo uma cavidade. Cada um dentre o primeiro polipeptídeo (1702) e o segundo polipeptídeo (1708) também contém mutações de direcionamento eletrostáticas, por exemplo, E357K. Da mesma forma, o terceiro e quarto polipeptídeos (1714 e 1716, respectivamente) contêm, cada um, mutações de direcionamento eletrostáti-

cas, por exemplo, K370D. 1704, 1706, 1710, 1712, 1714 e 1716 contêm, cada um, a modificação de aminoácido R292P, que é representada por um diamante, e 1706 e 1712, cada um, contêm a modificação de aminoácido I253A, que é representada por um asterisco. 1702 e 1708 têm, cada um, a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 77. 1714 e 1716 têm, cada um, a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 70.

[00175] A FIG. 18N é uma ilustração de um construto de Fc (construto 18) contendo três domínios Fc formados por quatro polipeptídeos. Cada um dentre o primeiro polipeptídeo (1802) e o segundo polipeptídeo (1808) contém um monômero de domínio Fc contendo aminoácidos carregados na interface C_H3-C_H3 em relação à sequência do tipo selvagem (1806 e 1812, respectivamente) unida por meio de um peptídeo de ligação a um monômero de domínio Fc contendo uma protuberância (1804 e 1810, respectivamente). O terceiro e quarto polipeptídeos (1814 e 1816, respectivamente) contém, cada um, um monômero de domínio Fc contendo uma cavidade. Cada um dentre o primeiro polipeptídeo (1802) e o segundo polipeptídeo (1808) também contém mutações de direcionamento eletrostáticas, por exemplo, E357K. Da mesma forma, o terceiro e quarto polipeptídeos (1814 e 1816, respectivamente) contêm, cada um, mutações de direcionamento eletrostáticas, por exemplo, K370D. 1804, 1806, 1810, 1812, 1814, e 1816 contêm, cada um, a modificação de aminoácido R292P, que é representada por um diamante, e 1804, 1810, 1814, e 1816 contêm, cada um, a modificação de aminoácido I253A, que é representada por um asterisco. 1802 e 1808 têm, cada um, a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 78. 1814 e 1816 têm, cada um, a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 73.

[00176] A FIG. 18O é uma ilustração de um construto de Fc (construto 19) contendo três domínios Fc formados por quatro polipeptídeos.

Cada um dentre o primeiro polipeptídeo (1902) e o segundo polipeptídeo (1908) contém um monômero de domínio Fc contendo aminoácidos carregados na interface C_H3-C_H3 em relação à sequência do tipo selvagem (1906 e 1912, respectivamente) unida por meio de um pep-tídeo de ligação a um monômero de domínio Fc contendo uma protuberância (1904 e 1910, respectivamente). O terceiro e quarto polipeptídeos (1914 e 1916, respectivamente) contém, cada um, um monômero de domínio Fc contendo uma cavidade. Cada um dentre o primeiro polipeptídeo (1902) e o segundo polipeptídeo (1908) também contém mutações de direcionamento eletrostáticas, por exemplo, E357K. Da mesma forma, o terceiro e quarto polipeptídeos (1914 e 1916, respectivamente) contêm, cada um, mutações de direcionamento eletrostáticas, por exemplo, K370D. 1904, 1906, 1910, 1912, 1914 e 1916 contêm, cada um, as modificações de aminoácido R292P, que é representado por um losango e I253A, que é representado por um asterisco. 1902 e 1908 têm, cada um, a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 79. 1914 e 1916 têm, cada um, a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 73.

[00177] A FIG. 18P é um western blot que mostra a expressão dos construto 4, construto 5 e construto 7.

[00178] A FIG. 19A é um gráfico que mostra a ligação celular de IgG1 e construto 4, construto 6, construto 16 e construto 18 por TR-FRET para Fc_γRIIb (média ± desvio padrão mostrados para 3-8 replicatas).

[00179] A FIG. 19B é um gráfico que mostra a ligação celular de IgG1 e construto 4, construto 6, construto 16 e construto 18 por TR-FRET para Fc_γRI (média ± desvio padrão mostrados para 3-8 replicatas).

[00180] A FIG. 19C é um gráfico que mostra a ligação celular de IgG1 e construto 4, construto 6, construto 16 e construto 18 por TR-

FRET para Fc γ RIIa (média ± desvio padrão mostrados para 3-8 replicatas).

[00181] A FIG. 19D é um gráfico que mostra a ligação celular de IgG1 e construto 4, construto 6, construto 16 e construto 18 por TR-FRET para Fc γ RIIa (média ± desvio padrão mostrados para 3-8 replicatas).

[00182] A FIG. 20 é um gráfico que mostra a ligação do construto 4, construto 7, construto 6, construto 16, construto 18 e construto 19 por ressonância plasmônica de superfície (SPR) a FcRn em pH 6,0. O nível de ligação máximo normalizado é proporcional ao número de domínios funcionais para ligar FcRn.

[00183] A FIG. 21 é um gráfico comparando a farmacocinética do construto 4, construto 6, construto 16 e IVIg em camundongos.

[00184] A FIG. 22 é um gráfico comparando a farmacocinética dos construtos 4, construto 5, construto 6 e construto 7 para avaliar o impacto do número de domínios com ligação reduzida de FcRn, por exemplo, mutações I253A, na farmacocinética em camundongos.

[00185] A FIG. 23 é um gráfico comparando a farmacocinética do construto 20 (construto 4), construto 16, construto 18 e construto 19 em camundongos.

[00186] A FIG. 24 é um gráfico comparando a inibição da fagocitose em células THP-1 induzidas por IVIg, construto 4, construto 6, construto 16 e construto 18.

[00187] A FIG. 25 é um gráfico que compara a inibição da liberação de IL-8 em monócitos induzidos por IgG1, construto 4, construto 6, construto 16 azul-escuro e construto 18.

[00188] A FIG. 26 é um gráfico comparando a inibição da citotoxicidade mediada por células dependentes de anticorpo (ADCC) induzida pelo construto 4, construto 5, construto 6, construto 7, construto 16, construto 18 e construto 19.

[00189] A FIG. 27 é um gráfico comparando a eficácia do construto 4, construto 6, construto 16 e construto 18 em várias concentrações em um modelo de artrite induzida por anticorpo de colágeno (CAIA) conforme medido pelas pontuações clínicas do Dia 12.

[00190] A FIG. 28 é um gráfico comparando a eficácia do construto 4 e do construto 18 no modelo de CAIA dosado profilaticamente no Dia 1, conforme medido pelas pontuações clínicas.

[00191] A FIG. 29 é um gráfico comparando a eficácia do construto 4 e do construto 18 no modelo de CAIA dosado profilaticamente no Dia -3 conforme medido por pontuações clínicas.

[00192] A FIG. 30 é um gráfico comparando a eficácia do construto 4 e do construto 18 no modelo de CAIA dosado profilaticamente no Dia -7 conforme medido por pontuações clínicas.

[00193] A FIG. 31 é um gráfico comparando a eficácia do construto 4 e do construto 18 no modelo de CAIA dosado profilaticamente no Dia -10, conforme medido por pontuações clínicas.

[00194] A FIG. 32 é um gráfico que compara a eficácia do construto 4 (AA: quadrados pretos, linha sólida), construto 18, (Q1: triângulos pretos, linha tracejada), construto 19 (Q2: diamantes pretos, linha pontilhada), ou salina (círculos cinzas, linha tracejada-pontilhada) dosados profilaticamente a 100 mg/kg no dia 1 em um modelo de artrite induzido por anticorpo contra colágeno (CAIA). Um volume de solução salina equivalente (círculos cinzas, linha tracejada-pontilhada) foi dosado no dia 1. A média e o erro padrão da média são mostrados para cada ponto no tempo.

[00195] A FIG. 33 é um gráfico que compara a eficácia do construto 4 (AA: quadrados pretos, linha sólida), construto 18, (Q1: triângulos pretos, linha tracejada), ou construto 19 (Q2: diamantes pretos, linha pontilhada), dosados profilaticamente a 100 mg/kg no dia -3 em um modelo de artrite induzido por anticorpo contra colágeno (CAIA). Um

volume de solução salina equivalente (círculos cinzas, linha tracejada-pontilhada) foi dosado no dia 1. A média e o erro padrão da média são mostrados para cada ponto no tempo.

[00196] A FIG. 34 é um gráfico que compara a eficácia do construto 4 (AA: quadrados pretos, linha sólida), construto 18, (Q1: triângulos pretos, linha tracejada), ou construto 19 (Q2: diamantes pretos, linha pontilhada), dosados profilaticamente a 100 mg/kg no dia -7 em um modelo de artrite induzido por anticorpo contra colágeno (CAIA). Um volume de solução salina equivalente (círculos cinzas, linha tracejada-pontilhada) foi dosado no dia 1. A média e o erro padrão da média são mostrados para cada ponto no tempo.

[00197] A FIG. 35 é um gráfico que compara a eficácia do construto 4 (AA: quadrados pretos, linha sólida), construto 18, (Q1: triângulos pretos, linha tracejada), ou construto 19 (Q2: diamantes pretos, linha pontilhada), dosados profilaticamente a 100 mg/kg no dia -10 em um modelo de artrite induzido por anticorpo contra colágeno (CAIA). Um volume de solução salina equivalente (círculos cinzas, linha tracejada-pontilhada) foi dosado no dia 1. A média e o erro padrão da média são mostrados para cada ponto no tempo.

[00198] A FIG. 36 é um gráfico que compara o perfil da cromatografia por exclusão de tamanho de construtos purificados X1 (cinza) e X2 (preto), normalizados para o pico máximo.

[00199] A FIG. 37 é uma imagem do resultado de eletroforese de gel de dodecil sulfato de sódio não reduzido para o construto purificado X1 (direita), construto X2 purificado (meio) e padrões de peso molecular (direita). Massas iguais dos dois construtos foram carregadas.

[00200] A FIG. 38 é um gráfico comparando a farmacocinética do construto X1 (multímero de Fc de tipo selvagem) (círculos pretos, linha sólida) e construto X2 (multímero de Fc com mutações I253A/R292P) (triângulos, linha tracejada) para avaliar o impacto da redução da liga-

ção a FcRn e Fc γ RIIb na farmacocinética. A média e o desvio-padrão são mostrados para cada ponto no tempo.

[00201] A FIG. 39 é um gráfico que mostra a farmacocinética dos construtos 6 (círculos; SEQ ID NOs: 64 e 63), 16 (triângulos; SEQ ID NOs: 76/70), e 18 (quadrados; SEQ ID NOs: 78 e 73) dosados a 10 mg/kg em macacos cinomolgos. Construto 4 (triângulos invertidos; SEQ ID NOs: 49 e 48) foi dosado a 20 mg/kg em macacos cinomolgos.

[00202] A FIG. 40 é um gráfico que mostra a farmacocinética dos construtos 6 (círculos cinzas; SEQ ID NOs: 64 e 63), 16 (diamantes; SEQ ID NOs: 76 e 70), e 18 (triângulos invertidos; SEQ ID NOs: 78 e 73) dosados a 30 mg/kg em macacos cinomolgos. O construto 4 (SEQ ID NOs: 49 e 48) foi dosado a 20 mg/kg (quadrados), 30 mg/kg (círculos) e 50 mg/kg (triângulos) em macacos cinomolgos.

DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO

[00203] As proteínas terapêuticas que incluem os domínios Fc de IgG podem ser usadas para tratar a inflamação e doenças imunológicas e inflamatórias, cânceres e infecções. A presente descrição apresenta composições e métodos para preparar construtos de Fc contendo domínios Fc (por exemplo, construtos de Fc tendo 2-10 domínios Fc, por exemplo, construtos de Fc tendo 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, ou 10 domínios Fc). Os construtos de Fc descritos neste documento facilitam a preparação de composições farmacêuticas homogêneas através da incorporação de características estruturais (por exemplo, espaçadores de glicina) que aumentam significativamente o resultado da fabricação.

[00204] Nesse sentido, a descrição apresenta composições farmacêuticas que incluem uma população substancialmente homogênea de um construto de Fc descrito neste documento (por exemplo, um construto de Fc tendo três domínios Fc). A homogeneidade é um aspecto importante de uma composição farmacêutica uma vez que esta influ-

encia a farmacocinética e o desempenho in vivo da composição. Tradicionalmente, na fabricação de produtos farmacêuticos, existe o problema de heterogeneidade do produto que pode ser causado por diversos fatores dependendo de como o produto é produzido. Por exemplo, o produto farmacêutico pode sofrer clivagem do produto aleatória, proteólise, degradação e/ou agregação, associação inespecífica de subunidades, e/ou dobramento de proteína ineficiente. Diferentes organismos com diferentes processos biossintéticos ou maquinários celulares que são usados para produzir o produto farmacêutico também podem causar heterogeneidade no produto. Geralmente, a cultura inicial contendo o produto farmacêutico desejado precisa sofrer um processo de purificação rigoroso para produzir uma composição menos heterogênea contendo o produto farmacêutico.

[00205] A descrição apresenta, em um aspecto, construtos de Fc tendo características estruturais que melhoram significativamente a eficiência do dobramento dos construtos de Fc e minimizam a associação inespecífica das subunidades, levando, assim, a composições farmacêuticas contendo esses construtos de Fc com alta homogeneidade. Ter um alto grau de homogeneidade garante a segurança, eficácia, uniformidade e confiabilidade da composição farmacêutica. Ter um alto grau de homogeneidade também minimiza a potencial agregação ou degradação do produto farmacêutico causada por materiais não desejados (por exemplo, produtos de degradação e/ou produtos agregados ou multímeros), bem como limita efeitos inespecíficos e efeitos colaterais adversos causados pelos materiais não desejados.

[00206] Conforme descrito em mais detalhes neste documento, a descrição apresenta composições substancialmente homogêneas contendo construtos de Fc em que todos têm o mesmo número de domínios Fc, bem como os métodos de preparação dessas composições substancialmente homogêneas.

[00207] Os construtos de Fc descritos neste documento incluem espaçadores de glicina entre os domínios Fc. Como é bem conhecido na técnica, peptídeos de ligação contendo serinas e glicinas proporcionam flexibilidade estrutural em uma proteína e são comumente usados para unir dois polipeptídeos. Observamos através de experimentação (vide o Exemplo 4) que os peptídeos de ligação contendo serinas e glicinas sofrem O-glicosilação (por exemplo, O-xilosilação) em múltiplas serinas no peptídeo de ligação e proteólise no lado N-terminal da serina. Nosso objetivo é otimizar a sequência do peptídeo de ligação e o comprimento para melhorar ainda mais a homogeneidade dos construtos de Fc. Produzimos construtos de Fc nos quais todos os peptídeos de ligação dentro dos construtos são espaçadores de glicina tendo apenas glicinas (por exemplo, pelo menos 12 glicinas, por exemplo, 12-30 glicinas, SEQ ID NO: 27). Ter todos os espaçadores de glicina nos construtos de Fc melhora ainda mais a homogeneidade dos construtos de Fc por remoção da O-glicosilação em serinas e através também da diminuição da taxa de proteólise dos construtos (vide o Exemplo 4). Consequentemente, fomos capazes de obter uma população mais substancialmente homogênea de construtos de Fc, usando todos os espaçadores de glicina nos construtos de Fc.

[00208] A homogeneidade é o resultado dos componentes do construto de Fc. Por exemplo, em uma primeira abordagem ("abordagem (a)"), pode ser utilizada a incorporação de peptídeos de ligação contendo apenas glicinas para unir os monômeros de domínio Fc. Observamos através de experimentação que todos os espaçadores de glicina (por exemplo, pelo menos 12 glicinas, por exemplo, 12-30 glicinas; SEQ ID NO: 27) em um construto de Fc não sofrem O-glicosilação e são menos susceptíveis à proteólise em comparação aos peptídeos de ligação tradicionais que incluem serinas e glicinas (vide o Exemplo 4).

[00209] Além disso, em outra abordagem ("abordagem (b)'), a ho-

mogeneidade de uma composição contendo um construto de Fc descrito neste documento (por exemplo, um construto de Fc tendo três domínios Fc) é melhorada pela remoção de lisinas C-terminais. Esse resíduo de lisina C-terminal é altamente conservado em imunoglobulinas por muitas espécies e pode ser total ou parcialmente removido pelo maquinário celular durante a produção de proteínas. A remoção de lisinas C-terminais nos construtos de Fc da descrição melhora a uniformidade da composição resultante e obtém uma preparação de construto de Fc mais homogênea (vide o Exemplo 8). Por exemplo, em algumas modalidades de construtos de Fc descritos neste documento (por exemplo, um construto de Fc tendo três domínios Fc), o códon da lisina C-terminal é removido, gerando, assim, construtos de Fc tendo polipeptídeos sem resíduos de lisina C-terminal e uma população homogênea resultante.

[00210] Uma outra abordagem ("abordagem (c)") para melhorar a homogeneidade de uma composição contendo um construto de Fc descrito neste documento (por exemplo, um construto de Fc tendo três domínios Fc), dois conjuntos de módulos de seletividade de heterodimerização foram utilizados: (i) módulos de seletividade de heterodimerização tendo diferentes mutações de carga inversa e (ii) módulos de seletividade de heterodimerização tendo cavidades e protuberâncias manipuladas. Observamos através de experimentação, por exemplo, vide o Exemplo 6, que, ao tentar formar um domínio Fc heterodimérico em um construto de Fc, tendo (i) e (ii), melhora ainda a homogeneidade da composição farmacêutica produzida pela redução da associação não controlada de monômeros de domínio Fc, e, portanto, oligômeros e multímeros indesejáveis. Em exemplos específicos, um monômero de domínio Fc contendo (i) pelo menos uma mutação de carga inversa e (ii) pelo menos uma cavidade manipulada ou pelo menos uma protuberância manipulada pode ser produzido e se combinará seletivamente.

te com outro monômero de domínio Fc contendo (i) pelo menos uma mutação de carga inversa e (ii) pelo menos uma protuberância manipulada ou pelo menos uma cavidade manipulada para formar um domínio Fc. Em outro exemplo, um monômero de domínio Fc contendo uma mutação de carga inversa K370D e cavidades manipuladas Y349C, T366S, L368A, e Y407V e outro monômero de domínio Fc contendo uma mutação de carga inversa E357K e protuberâncias manipuladas S354C e T366W podem ser produzidos e se combinarão seletivamente para formar um domínio Fc.

[00211] Conforme descrito em detalhes neste documento, uma composição substancialmente homogênea contendo um construto de Fc da descrição (por exemplo, um construto de Fc tendo três domínios Fc) pode ser obtida usando todos os espaçadores de glicina entre dois monômeros de domínio Fc no construto de Fc (Abordagem (a)), usando polipeptídeos que não possuem lisinas C-terminais no construto de Fc (abordagem (b)), e/ou usando dois conjuntos de módulos de seletividade de heterodimerização ((i) módulos de seletividade de heterodimerização tendo diferentes mutações de carga inversa e (ii) módulos de seletividade de heterodimerização tendo cavidades e protuberâncias manipuladas) para promover a formação do domínio Fc heterodimérico por alguns monômeros de domínio Fc no construto de Fc (abordagem (c)).

[00212] Em algumas modalidades, uma composição substancialmente homogênea contendo um construto de Fc descrito neste documento (por exemplo, um construto de Fc tendo três domínios Fc) pode ser obtida através da abordagem (a).

[00213] Em algumas modalidades, uma composição substancialmente homogênea contendo um construto de Fc descrito neste documento (por exemplo, um construto de Fc tendo três domínios Fc) pode ser obtida através da abordagem (b).

[00214] Em algumas modalidades, uma composição substancialmente homogênea contendo um construto de Fc descrito neste documento (por exemplo, um construto de Fc tendo três domínios Fc) pode ser obtida através da abordagem (c).

[00215] Em algumas modalidades, uma composição substancialmente homogênea contendo um construto de Fc descrito neste documento (por exemplo, um construto de Fc tendo três domínios Fc) pode ser obtida através de uma combinação das abordagens (a) e (b).

[00216] Em algumas modalidades, uma composição substancialmente homogênea contendo um construto de Fc descrito neste documento (por exemplo, um construto de Fc tendo três domínios Fc) pode ser obtida através de uma combinação das abordagens (a) e (c).

[00217] Em algumas modalidades, uma composição substancialmente homogênea contendo um construto de Fc descrito neste documento (por exemplo, um construto de Fc tendo três domínios Fc) pode ser obtida através de uma combinação das abordagens (b) e (c).

[00218] Em algumas modalidades, uma composição substancialmente homogênea contendo um construto de Fc descrito neste documento (por exemplo, um construto de Fc tendo três domínios Fc) pode ser obtida através de uma combinação das abordagens (a), (b) e (c).

[00219] Em algumas modalidades, para melhorar ainda mais a homogeneidade da composição farmacêutica contendo um construto de Fc descrito neste documento, o Asp N-terminal em um ou mais dos polipeptídeos no construto de Fc na composição sofre mutação para Gln. Em algumas modalidades de uma composição que inclui uma população substancialmente homogênea de um construto de Fc descrito neste documento, o Asp N-terminal em cada um dos polipeptídeos no construto de Fc na composição sofre mutação para Gln.

[00220] Além disso, nos construtos de Fc da descrição (por exemplo, um construto de Fc tendo três domínios Fc), o comprimento dos

peptídeos de ligação que unem os monômeros de domínio Fc influencia a eficiência do dobramento dos construtos de Fc. Em algumas modalidades, um peptídeo de ligação tendo pelo menos 4, 8, ou 12 glicinas (por exemplo, 4-30, 8-30, 12-30 glicinas; SEQ ID NOs: 26 e 27) pode ser usado para unir monômeros de domínio Fc em construtos de Fc da descrição.

I. Monômeros de domínio Fc

[00221] Um monômero de domínio Fc inclui um domínio dobradiça, um domínio constante de anticorpo C_H2, e um domínio constante de anticorpo C_H3. O monômero de domínio Fc pode ser de diferentes origens, por exemplo, humana, de camundongo, ou de rato. O monômero de domínio Fc pode ser do isotipo de anticorpo imunoglobulina IgG, IgE, IgM, IgA, ou IgD. O monômero de domínio Fc também pode ser de qualquer isotipo de anticorpo de imunoglobulina (por exemplo, IgG1, IgG2a, IgG2b, IgG3, ou IgG4). Os monômeros de domínio Fc também podem ser híbridos, por exemplo, com a dobradiça e C_H2 de IgG1 e o C_H3 de IgA, e com a dobradiça e C_H2 de IgG1, mas o C_H3 de IgG3. Um dímero de monômeros de domínio Fc é um domínio Fc (posteriormente definido neste documento) que pode ser ligar a um receptor Fc, por exemplo, FcγRIIIa, que é um receptor localizado na superfície de leucócitos. Na presente descrição, o domínio constante de anticorpo C_H3 de um monômero de domínio Fc pode conter substituições de aminoácidos na interface dos domínios constantes de anticorpo C_H3-C_H3 para promover sua associação um com outro. Em outras modalidades, um monômero de domínio Fc inclui uma fração adicional, por exemplo, um peptídeo de ligação à albumina ou um peptídeo de purificação, ligado ao terminal N ou C. Na presente descrição, um monômero de domínio Fc não contém qualquer tipo de região variável de anticorpo, por exemplo, V_H, V_L, uma região determinante de complementariedade (CDR), ou uma região hipervariável (HVR).

[00222] Em algumas modalidades, um monômero de domínio Fc em um construto de Fc descrito neste documento (por exemplo, um construto de Fc tendo três domínios Fc) pode compreender, consistir em, ou consistir essencialmente em uma sequência que seja pelo menos 95% idêntica (por exemplo, pelo menos 97%, 99%, ou 99,5% idêntica) à sequência de um monômero de domínio Fc do tipo selvagem (SEQ ID NO: 42). Em algumas modalidades, um monômero de domínio Fc em um construto de Fc descrito neste documento (por exemplo, um construto de Fc tendo três domínios Fc) pode compreender, consistir, ou consistir essencialmente em uma sequência que seja um monômero de domínio Fc do tipo selvagem (SEQ ID NO: 42) com até 10 (9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2, ou 1) modificações de aminoácidos únicos (por exemplo, substituições, por exemplo, substituições conservativas). Em algumas modalidades, um monômero de domínio Fc em um construto de Fc descrito neste documento (por exemplo, um construto de Fc tendo três domínios Fc) pode compreender, consistir em, ou consistir essencialmente em uma sequência que seja pelo menos 95% idêntica (por exemplo, pelo menos 97%, 99%, ou 99,5% idêntica) à sequência de qualquer uma das SEQ ID NOs: 44, 46, 48, e 50-53 (vide o Exemplo 1, Tabelas 4 e 5). Em algumas modalidades, um monômero de domínio Fc em um construto de Fc descrito neste documento (por exemplo, um construto de Fc tendo três domínios Fc) pode compreender, consistir em, ou consistir essencialmente em uma sequência que seja aquela de qualquer uma das SEQ ID NOs: 44, 46, 48, e 50-53 (vide o Exemplo 1, Tabelas 4 e 5) com até 10 (9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2, ou 1) modificações de aminoácidos únicos (por exemplo, substituições conservativas). Em alguns casos, essas modificações de aminoácido são adicionais à alteração no comprimento do espaçador de glicina, isto é, até 10 (9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 ou 1) modificações de aminoácidos únicos além das alterações no comprimento do

espaçador de glicina (SEQ ID NO:23). Em certas modalidades, um monômero de domínio Fc no construto de Fc pode compreender, consistir em, ou consistir essencialmente em uma sequência que seja pelo menos 95% idêntica (por exemplo, pelo menos 97%, 99%, ou 99,5% idêntica) à sequência de qualquer uma das SEQ ID NOs: 48, 52, e 53. Em certas modalidades, um monômero de domínio Fc no construto de Fc pode compreender, consistir em, ou consistir essencialmente na sequência de qualquer uma das SEQ ID NOs: 48, 52, e 53 com até 10 (por exemplo, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2, ou 1) modificações de aminoácidos únicos (por exemplo, substituições, por exemplo, substituições conservativas).

SEQ ID NO: 42: sequência de aminoácidos do monômero de domínio Fc de IgG1 humana do tipo selvagem

DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVS
HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQD
WLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPVYTLPPSRDELT
KNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFL
YSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO: 44

DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVS
HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQD
WLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPVYTLPPSRDELT
KNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFL
VSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO: 46

DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVS
HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQD

WLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIASKAKGQPREPQVCTLPPSRDELT
KNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFL
VSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG

SEQ ID NO: 48

DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVS
HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVSVLTVLHQD
WLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIASKAKGQPREPQVCTLPPSRDELT
KNQVSLSCAVDGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFF
LVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG

SEQ ID NO: 50

DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVS
HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVSVLTVLHQD
WLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIASKAKGQPREPQVYTLPPCRDELT
KNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFF
LYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO: 51

DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVS
HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVSVLTVLHQD
WLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIASKAKGQPREPQVYTLPPSRDELT
KNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVVLKSDGSFFL
YSDLTVVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO: 52

DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVS
HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVSVLTVLHQD
WLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIASKAKGQPREPQVYTLPPSRDELT
KNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVVLKSDGSFFL

YSDLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG

SEQ ID NO: 53

DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVS
 HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCRDKLT
 KNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

II. Domínios Fc

[00223] Conforme definido neste documento, um domínio Fc inclui dois monômeros de domínio Fc que são dimerizados pela interação entre os domínios constantes de anticorpo CH3. Na presente descrição, um domínio Fc não inclui uma região variável de um anticorpo, por exemplo, VH, VL, CDR, ou HVR. Um domínio Fc forma a estrutura mínima que se liga a um receptor Fc, por exemplo, receptores Fc gamma (isto é, receptores Fcγ (FcγR)), receptores Fc-alfa (isto é, receptores Fcα (FcαR)), receptores Fc-épsilon (isto é, receptores Fcε (FcεR)), e/ou o receptor Fc neonatal (FcRn). Em algumas modalidades, um domínio Fc da presente descrição se liga a um receptor Fcγ (por exemplo, FcγRI (CD64), FcγRIIa (CD32), FcγRIIb (CD32), FcγRIIIa (CD16a), FcγRIIIb (CD16b)), e/ou FcγRIV e/ou o receptor Fc neonatal (FcRn).

III. Modificações no domínio Fc

[00224] Um monômero de domínio Fc não modificado pode ser um monômero de domínio Fc humano de ocorrência natural ou um monômero de domínio Fc humano WT. Um monômero de domínio Fc pode ser um monômero de domínio Fc humano de ocorrência natural que compreende uma dobradiça, um domínio CH2, e um domínio CH3; ou uma variante do mesmo tendo até 16 (por exemplo, até 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, ou 16) modificações de aminoá-

cidos (por exemplo, modificações de aminoácidos únicos) para acomodar ou promover a dimerização dirigida. Um monômero de domínio Fc pode ser um domínio Fc de IgG1, um domínio Fc de IgG2, um domínio Fc de IgG3, um domínio Fc de IgG4, ou uma combinação destes. Um monômero de domínio Fc pode ser um domínio Fc de IgG1, um domínio Fc de IgG2, um domínio Fc de IgG3, um domínio Fc de IgG4, ou uma combinação destes com até 10 (9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 ou 1) modificações de aminoácidos únicos (por exemplo, substituições, por exemplo, substituições conservativas). Em alguns casos, o monômero de domínio Fc é um monômero de domínio Fc de IgG humana tendo até dez modificações de aminoácido (por exemplo, não mais do que 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 ou 16 modificações de aminoácido). Em alguns casos, o monômero de domínio Fc comprehende, consiste em, ou consiste essencialmente na sequência de SEQ ID NO: 42 com não mais do que dez modificações de aminoácido (por exemplo, não mais do que 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, ou 16 modificações de aminoácido). Em alguns casos, o domínio Fc inclui pelo menos uma modificação de aminoácido, em que as modificações de aminoácidos alteram um ou mais dentre (i) afinidade de ligação a um ou mais receptores Fc, (ii) funções efetoras, (iii) o nível de sulfatação do domínio Fc, (iv) meia-vida, (v) resistência à protease, (vi) estabilidade do domínio Fc, e/ou (vii) susceptibilidade à degradação (por exemplo, em comparação ao domínio Fc não modificado). Em alguns casos, o domínio Fc inclui não mais de 16 modificações de aminoácidos (por exemplo, mais de 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, ou 16 modificações de aminoácidos no domínio CH3).

[00225] Pelo menos um domínio Fc de um construto de Fc de acordo com a descrição inclui uma modificação de aminoácido na posição I253 (por exemplo, I253A, I253C, I253D, I253E, I253F, I253G, I253H, I253I, I253K, I253L, I253M, I253N, I253P, I253Q, I253R, I253S, I253T,

I253V, I253W, ou I253Y) e/ou na posição R292 (por exemplo, R292P, R292D, R292E, R292L, R292Q, R292R, R292T, e R292Y). Em alguns casos, pelo menos um domínio Fc inclui uma modificação de aminoácido na posição I253, por exemplo, I253A. Em alguns casos, pelo menos um domínio Fc inclui uma modificação de aminoácido na posição R292, por exemplo, R292P. Um domínio Fc pode incluir uma modificação de aminoácido na posição I253 (por exemplo, I253A) e na posição R292 (por exemplo, R292P). Por exemplo, um construto de Fc tendo três domínios Fc pode incluir uma modificação de aminoácido na posição I253 (por exemplo, I253A) em um, dois ou todos os três domínios Fc e pode adicionalmente, ou alternativamente, incluir uma modificação de aminoácido na posição R292 (por exemplo, R292P) em um, dois ou todos os três domínios Fc. Construtos de Fc exemplares com modificações de aminoácido I253A e/ou R292P são representados nas FIG. 2 e FIGURAS 18B-18O.

[00226] Em algumas modalidades, modificações de domínio Fc que alteram meia-vida podem diminuir a ligação de um domínio Fc modificado a FcRn, por exemplo, pela modificação do domínio Fc na posição I253. Modificações na posição I253 podem incluir uma substituição de aminoácido, em que o aminoácido na posição I253 é substituído por um aminoácido natural ou não natural; uma deleção do aminoácido na posição I253; ou uma inserção de um ou mais resíduos de aminoácidos na posição I253 do domínio Fc. A modificação de aminoácido I253 pode ser parte de uma combinação de múltiplas modificações (por exemplo, em outras posições de resíduos, por exemplo, R292), por exemplo, uma combinação de uma ou mais substituições, deleções e/ou inserções de aminoácidos. Em modalidades particulares, um construto de Fc pode conter, por exemplo, três domínios Fc, em que pelo menos um domínio Fc contém uma modificação na posição I253. Por exemplo, o resíduo de aminoácido de tipo selvagem, por

exemplo, isoleucina (I), na posição I253, pode ser substituído por um aminoácido natural ou não natural, por exemplo, alanina (A). Em alguns casos, cada modificação de aminoácido na posição I253 é independentemente selecionada dentre, por exemplo, I253A, I253C, I253D, I253E, I253F, I253G, I253H, I253I, I253K, I253L, I253M, I253N, I253P, I253Q, I253R, I253S, I253T, I253V, I253W, e I253Y.

[00227] Em outras modalidades, modificações de domínio Fc que alteram meia-vida podem alterar a ligação de um domínio Fc modificado a Fc γ RIIb, por exemplo, por modificação do domínio Fc na posição R292. Modificações na posição R292 podem incluir uma substituição de aminoácido, em que o aminoácido na posição R292 é substituído por um aminoácido natural ou não natural; uma deleção do aminoácido na posição R292; ou uma inserção de um ou mais resíduos de aminoácidos na posição R292 do domínio Fc. A modificação de aminoácido 292 pode ser uma combinação de múltiplas modificações (por exemplo, em outras posições de resíduos, por exemplo, I253) por exemplo, uma combinação de uma ou mais substituições, deleções e/ou inserções de aminoácidos. Em modalidades particulares, um construto de Fc pode conter, por exemplo, três domínios Fc, em que pelo menos um domínio Fc contém uma modificação na posição R292. Por exemplo, o resíduo de aminoácido de tipo selvagem, por exemplo, arginina (R), na posição 292, pode ser substituído por um aminoácido natural ou não natural, por exemplo, prolina (P). Em alguns casos, cada modificação de aminoácido na posição R292 é independentemente selecionada dentre, por exemplo, R292P, R292D, R292E, R292L, R292Q, R292R, R292T e R292Y.

[00228] Domínios Fc exemplificativos com afinidade de ligação alterada aos receptores Fc incluem monômeros de Fc contendo os mutantes duplos S267E/L328F. As mutações de S267E/L328F anteriormente demonstraram potencialização significativa e específica da ligação

de IgG1 ao receptor Fc γ RIIb (Chu et al., Molecular Immunology 45 2008).

[00229] Uma modificação de aminoácido, por exemplo, para alterar a meia-vida, na posição I253, por exemplo, I253A, pode ocorrer em pelo menos um (por exemplo, 1, 2, 3, 4 ou 5) domínio Fc de um construto de Fc, por exemplo, construto 4 (FIG. 2). Em outras modalidades, uma modificação de aminoácido na posição R292, por exemplo, R292P, pode ocorrer em pelo menos um (por exemplo, 1, 2, 3, 4 ou 5) domínio Fc de um construto de Fc, por exemplo, construto 4 (FIG. 2). Em algumas modalidades, por exemplo, uma modificação de aminoácido pode ocorrer na posição I253, por exemplo, I253A, e posição R292, por exemplo, R292P. Por exemplo, um construto de Fc, por exemplo, construto 4 (FIG. 2), pode conter um domínio Fc com uma modificação de aminoácido em I253, por exemplo, I253A, e conter pelo menos um (por exemplo, 1, 2 ou 3) domínio Fc com uma modificação de aminoácido em R292, por exemplo, R292P. Em outra modalidade, um construto de Fc, por exemplo, construto 4 (FIG. 2), pode conter dois domínios Fc com uma modificação de aminoácido em I253, por exemplo, I253A, e conter pelo menos um (por exemplo, 1, 2 ou 3) domínio Fc com uma modificação de aminoácido em R292, por exemplo, R292P. Em ainda outra modalidade, um construto de Fc, por exemplo, construto 4, pode conter três domínios Fc com uma modificação de amino em I253, por exemplo, I293A, e conter pelo menos um domínio Fc (por exemplo, 1, 2 ou 3) com uma modificação de aminoácido em R292, por exemplo, R292P. Construtos de Fc exemplares com modificações na posição de aminoácido I253 e/ou R292, por exemplo, I293A e/ou R292P, respectivamente, são representados nas FIGURAS 18A-18O. Não representados na FIG. 18A-18O, mas contemplados pela descrição, são os construtos de Fc com combinações heterogêneas de modificações de aminoácidos, por exemplo, nas posições de aminoá-

cidos I253 e/ou R292, dentro dos monômeros de domínio Fc constituindo um domínio Fc.

IV. Módulos de seletividade de dimerização

[00230] Na presente descrição, um módulo de seletividade de dimerização é a parte do monômero do domínio Fc que facilita o pareamento preferencial de dois monômeros do domínio Fc para formar um domínio Fc. Especificamente, um módulo de seletividade de dimerização é parte do domínio constante de anticorpo C_H3 de um monômero do domínio Fc, o qual inclui substituições de aminoácido posicionadas na interface entre os domínios constantes de anticorpo C_H3 interativos de dois monômeros de domínio Fc. Em um módulo de seletividade de dimerização, as substituições de aminoácidos tornam favorável a dimerização dos dois domínios constantes de anticorpo C_H3 como resultado da compatibilidade dos aminoácidos escolhidos para tais substituições. A formação final do domínio Fc favorecido é seletiva sobre outros domínios Fc que se formam a partir de monômeros de domínio Fc que não possuem módulos de seletividade de dimerização ou com substituições de aminoácidos incompatíveis nos módulos de seletividade de dimerização. Este tipo de substituição de aminoácido pode ser feito usando técnicas de clonagem molecular convencionais bem conhecidas na técnica, tais como mutagênese QuikChange®.

[00231] Em algumas modalidades, um módulo de seletividade de dimerização inclui uma cavidade manipulada (descrita posteriormente neste documento) no domínio constante de anticorpo C_H3. Em outras modalidades, o módulo de seletividade de dimerização inclui uma protuberância manipulada (descrita posteriormente neste documento) no domínio constante de anticorpo C_H3. Para formar seletivamente um domínio Fc, dois monômeros de domínio Fc com módulos de seletividade de dimerização compatíveis, por exemplo, um domínio constante de anticorpo C_H3 contendo uma cavidade manipulada e o outro domí-

nio constante de anticorpo C_H3 contendo uma protuberância manipulada, combinam-se para formar um par de protuberância-em-cavidade de monômeros de domínio Fc. Protuberâncias manipuladas e cavidades manipuladas são exemplos de módulos de seletividade de heterodimerização, que podem ser feitas nos domínios constantes de anticorpo C_H3 dos monômeros de domínio Fc a fim de promover a heterodimerização favorável de dois monômeros de domínio Fc que tenham módulos de seletividade de heterodimerização compatíveis.

[00232] Em outras modalidades, um monômero de domínio Fc com um módulo de seletividade de dimerização contendo substituições de aminoácidos positivamente carregados e um monômero de domínio Fc com um módulo de seletividade de dimerização contendo substituições de aminoácidos negativamente carregados podem se combinar seletivamente para formar um domínio Fc através da orientação eletrostática favorável (descrita posteriormente neste documento) dos aminoácidos carregados. Em algumas modalidades, um monômero de domínio Fc pode incluir uma das seguintes substituições de aminoácidos positiva ou negativamente carregados: K392D, K392E, D399K, K409D, K409E, K439D, e K439E. Em um exemplo, um monômero do domínio Fc contendo uma substituição de aminoácido positivamente carregado, por exemplo, D356K ou E357K, e um monômero do domínio Fc contendo uma substituição de aminoácido negativamente carregado, por exemplo, K370D ou K370E, podem se combinar seletivamente para formar um domínio Fc através de orientação eletrostática favorável dos aminoácidos carregados. Em outro exemplo, um monômero de domínio Fc contendo E357K e um monômero de domínio Fc contendo K370D podem se combinar seletivamente para formar um domínio Fc através de orientação eletrostática favorável dos aminoácidos carregados. Em algumas modalidades, as substituições de aminoácidos de carga inversa podem ser usadas como módulos de seletividade de he-

terodimerização, em que dois monômeros de domínio Fc contendo substituições de aminoácidos de carga inversa diferentes, mas compatíveis, se combinam para formar um domínio Fc heterodimérico. Os módulos de seletividade de dimerização específicos são posteriormente listados, sem limitação, nas Tabelas 1 e 2A descritas posteriormente abaixo.

[00233] Em outras modalidades, dois monômeros de domínio Fc incluem módulos de seletividade de homodimerização contendo mutações de carga inversa idênticas em pelo menos duas posições dentro do anel de resíduos carregados na interface entre os domínios C_H3. Os módulos de seletividade de homodimerização são substituições de aminoácidos de carga inversa que promovem a homodimerização de monômeros de domínio Fc para formar um domínio Fc homodimérico. Ao inverter a carga de ambos os membros dos dois ou mais pares complementares de resíduos nos dois monômeros de domínio Fc, os monômeros de domínio Fc mutantes permanecem complementares aos monômeros de domínio Fc da mesma sequência mutante, mas têm uma menor complementaridade com os monômeros de domínio Fc sem essas mutações. Em uma modalidade, um domínio Fc inclui monômeros de domínio Fc que incluem os mutantes duplos K409D/D399K, K392D/D399K, E357K/K370E, D356K/K439D, K409E/D399K, K392E/D399K, E357K/K370D, ou D356K/K439E. Em outra modalidade, um domínio Fc inclui monômeros de domínio Fc incluindo mutantes quádruplos que combinam qualquer par de mutantes duplos, por exemplo, K409D/D399K/E357K/K370E. Exemplos de módulos de seletividade de homodimerização são mostrados posteriormente nas Tabelas 2B e 2C.

[00234] Em outras modalidades, um monômero de domínio Fc contendo (i) pelo menos uma mutação de carga inversa e (ii) pelo menos uma cavidade manipulada ou pelo menos uma protuberância manipu-

lada pode se combinar seletivamente com um outro monômero de domínio Fc contendo (i) pelo menos uma mutação de carga inversa e (ii) pelo menos uma protuberância manipulada ou pelo menos uma cavidade manipulada para formar um domínio Fc. Por exemplo, um monômero de domínio Fc contendo a mutação de carga inversa K370D e as cavidades manipuladas Y349C, T366S, L368A e Y407V e um outro monômero de domínio Fc contendo a mutação de carga inversa E357K e as protuberâncias manipuladas S354C e T366W podem se combinar seletivamente para formar um domínio Fc.

[00235] A formação desses domínios Fc é promovida pelas substituições de aminoácidos compatíveis nos domínios constantes de anticorpo C_H3. Dois módulos de seletividade de dimerização contendo substituições de aminoácidos incompatíveis, por exemplo, ambos contendo cavidades manipuladas, ambos contendo protuberâncias manipuladas, ou ambos contendo os mesmos aminoácidos carregados na interface C_H3-C_H3, não irão promover a formação de um domínio Fc heterodimérico.

[00236] Além disso, outros métodos usados para promover a formação de domínios Fc com monômeros de domínio Fc definidos incluem, sem limitação, a abordagem LUZ-Y (Publicação de Pedido de Patente U.S. nº WO2011034605) que inclui uma fusão C-terminal de α-hélices monoméricas de um zíper de leucina a cada um dos monômeros de domínio Fc para permitir a formação de heterodímeros, bem como a abordagem do corpo de domínio manipulado de troca de fita (SEED) (Davis et al., *Protein Eng Des Sel.* 23: 195-202, 2010) que gera domínio Fc com monômeros de domínio Fc heterodiméricos, com cada um incluindo segmentos alternados de sequências de C_H3 de IgA e IgG.

V. Cavidades manipuladas e protuberâncias manipuladas

[00237] O uso de cavidades manipuladas e protuberâncias manipu-

ladas (ou a estratégia de "knob-into-hole") é descrito por Carter e colaboradores (Ridgway et al.*Protein Eng.* 9:617-612, 1996; Atwell et al.*J Mol Biol.* 270:26-35, 1997; Merchant et al.*Nat Biotechnol.* 16:677-681, 1998). A interação de nó ("knob") e orifício ("hole") favorece a formação de heterodímeros, em que a interação knob-knob e hole-hole impede a formação de heterodímero devido ao choque estérico e deleção de interações favoráveis. A técnica "knob-into-hole" também é divulgada na Patente U.S. nº 5.731.168.

[00238] Na presente descrição, as cavidades manipuladas e protuberâncias manipuladas são usadas na preparação dos construtos de Fc descritos neste documento. Uma cavidade manipulada é um vazio que é criado quando um aminoácido original de uma proteína é substituído por um aminoácido diferente com um volume menor de cadeia lateral. Uma protuberância manipulada é uma saliência que é criada quando um aminoácido original de uma proteína é substituído por um aminoácido diferente com um volume maior de cadeia lateral. Especificamente, o aminoácido é substituído no domínio constante de anticorpo C_H3 de um monômero de domínio Fc e está envolvido com a dimerização de dois monômeros de domínio Fc. Em algumas modalidades, uma cavidade manipulada em um domínio constante de anticorpo C_H3 é criada para acomodar uma protuberância em um outro domínio constante de anticorpo C_H3, de tal modo que ambos os domínios constantes de anticorpo C_H3 atuam como módulos de seletividade de dimerização (por exemplo, os módulos de seletividade de heterodimerização) (descritos acima) que promovem ou favorecem a dimerização dos dois monômeros de domínio Fc. Em outras modalidades, uma cavidade manipulada em um domínio constante de anticorpo C_H3 é criada para acomodar melhor um aminoácido original em um outro domínio constante de anticorpo C_H3. Em ainda outras modalidades, uma protuberância manipulada em um domínio constante de anticorpo

C_{H3} é criada para formar interações adicionais com os aminoácidos originais em um outro domínio constante de anticorpo C_{H3} .

[00239] Uma cavidade manipulada pode ser construída através da substituição de aminoácidos contendo cadeias laterais maiores, tais como tirosina ou triptofano, por aminoácidos contendo cadeias laterais menores, tais como alanina, valina ou treonina. Especificamente, alguns módulos de seletividade de dimerização (por exemplo, os módulos de seletividade de heterodimerização) descritos adicionalmente acima) contêm cavidades manipuladas, tais como a mutação Y407V no domínio constante de anticorpo C_{H3} . Semelhantemente, uma protuberância manipulada pode ser construída ao substituir aminoácidos que contêm cadeias laterais menores por aminoácidos que contêm cadeias laterais maiores. Especificamente, alguns módulos de seletividade de dimerização (por exemplo, os módulos de seletividade de heterodimerização) (descritos adicionalmente acima) contêm protuberâncias manipuladas, tal como a mutação T366W no domínio constante de anticorpo C_{H3} . Na presente descrição, as cavidades manipuladas e as protuberâncias manipuladas também são combinadas com a manipulação da ligação de dissulfeto do domínio inter- C_{H3} para potencializar a formação de heterodímeros. Em um exemplo, um monômero de domínio Fc que contém as cavidades manipuladas Y349C, T366S, L368A e Y407V podem se combinar seletivamente com um outro monômero de domínio Fc que contém as protuberâncias S354C e T366W para formar um domínio Fc. Em um outro exemplo, um monômero de domínio Fc que contém a cavidade manipulada Y349C e um monômero de domínio Fc que contém a protuberância manipulada S354C podem se combinar seletivamente para formar um domínio Fc. Outras cavidades manipuladas e protuberâncias manipuladas, em combinação tanto com manipulação de ligação de dissulfeto quanto com cálculos estruturais (HA-TF misturados) estão incluídas, sem limitação, na

Tabela 1.

Tabela 1

Estratégia	Domínio constante de anticorpo CH ₃ do monômero de domínio Fc 1	Domínio constante de anticorpo CH ₃ do monômero de domínio Fc 2	Referência
Cavidades e protuberâncias manipuladas ("knob-into-hole")	Y407T	T366Y	US 8,216,805
	Y407A	T366W	US 8,216,805
	F405A	T394W	US 8,216,805
	Y407T	T366Y	US 8,216,805
	T394S	F405W	US 8,216,805
	T394W:Y407T	T366Y:F405A	US 8,216,805
	T394S:Y407A	T366W:F405W	US 8,216,805
	T366W:T394S	F405W:Y407A	US 8,216,805
Cavidades e protuberâncias manipuladas ("knob-into-hole"), manutenção S-S	T366S:L368A:Y407V:Y349C	T366W:S354C	Zeidler et al., <i>J Immunol.</i> 163:1246-52, 1999
HA-TF Misturados	S346H:F405A	Y349T:T394F	WO2006106905

[00240] Substituir um resíduo de aminoácido original no domínio constante de anticorpo C_H3 por um resíduo de aminoácido diferente pode ser obtido alterando o ácido nucléico que codifica o resíduo de aminoácido original. O limite superior para o número de resíduos de aminoácidos originais que podem ser substituídos é o número total de resíduos na interface dos domínios constantes de anticorpo C_H3, dado que a interação suficiente na interface ainda seja mantida. Em alguns casos, o domínio constante de anticorpo CH3 não tem mais do que 16 (por exemplo, não mais do que 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14 ou 16) modifica-

ções de aminoácidos únicos.

VI. Orientação eletrostática

[00241] A orientação eletrostática é a utilização de interações eletrostáticas favoráveis entre aminoácidos de carga oposta em peptídeos, domínios de proteínas e proteínas para controlar a formação de moléculas de proteína com maior ordenação. Um método de usar efeitos de orientação eletrostática para alterar a interação de domínios de anticorpo para reduzir a formação de homodímero a favor da formação de heterodímero na geração de anticorpos biespecíficos é divulgado na Publicação do Pedido de Patente U.S. nº 2014-0024111.

[00242] Na presente descrição, a orientação eletrostática é usada para controlar a dimerização de monômeros de domínio Fc e a formação de construtos de Fc. Particularmente, para controlar a dimerização de monômeros de domínio Fc usando a orientação eletrostática, um ou mais resíduos de aminoácidos que compõem a interface C_H3-C_H3 são substituídos por resíduos de aminoácidos carregados positiva ou negativamente, de tal modo que a interação se torna eletrostaticamente favorável ou desfavorável dependendo dos aminoácidos específicos carregados introduzidos. Em algumas modalidades, um aminoácido carregado positivamente na interface, como lisina, arginina ou histidina é substituído por um aminoácido carregado negativamente, tal como o ácido aspártico ou ácido glutâmico. Em outras modalidades, um aminoácido carregado negativamente na interface é substituído por um aminoácido carregado positivamente. Os aminoácidos carregados podem ser introduzidos em um dos domínios constantes de anticorpo C_H3 em interação, ou em ambos. Através da introdução de aminoácidos carregados nos domínios constantes de anticorpo C_H3 em interação, são criados módulos de seletividade de dimerização (descritos adicionalmente acima) que podem formar seletivamente dímeros de monômeros de domínio Fc, conforme controlado pelos efei-

tos da orientação eletrostática, resultando-se a partir da interação entre aminoácidos carregados.

[00243] Em algumas modalidades, para criar um módulo de seletividade de dimerização incluindo cargas invertidas que podem formar seletivamente dímeros dos monômeros de domínio Fc, conforme controlado pelos efeitos de orientação eletrostática, os dois monômeros de domínio Fc pode ser seletivamente formados através da heterodimerização ou homodimerização.

Heterodimerização de monômeros de domínio Fc

[00244] A heterodimerização de monômeros de domínio Fc pode ser promovida ao introduzir mutações diferentes, mas compatíveis, nos dois monômeros de domínio Fc, tais como os pares de resíduos de carga incluídos, sem limitação, na Tabela 2A. Em algumas modalidades, um monômero de domínio Fc pode incluir uma das seguintes substituições de aminoácidos positiva ou negativamente carregados: D356K, D356R, E357K, E357R, K370D, K370E, K392D, K392E, D399K, K409D, K409E, K439D e K439E. Em um exemplo, um monômero do domínio Fc contendo uma substituição de aminoácido positivamente carregado, por exemplo, D356K ou E357K, e um monômero do domínio Fc contendo uma substituição de aminoácido negativamente carregado, por exemplo, K370D ou K370E, podem se combinar seletivamente para formar um domínio Fc através de orientação eletrostática favorável dos aminoácidos carregados. Em outro exemplo, um monômero de domínio Fc contendo E357K e um monômero de domínio Fc contendo K370D podem se combinar seletivamente para formar um domínio Fc através de orientação eletrostática favorável dos aminoácidos carregados.

[00245] Por exemplo, em um construto de Fc tendo três domínios Fc, dois dos três domínios Fc podem ser formados pela heterodimerização de dois monômeros de domínio Fc, conforme promovido pelos

efeitos de orientação eletrostática. Um "domínio Fc heterodimérico" refere-se a um domínio Fc que é formado pela heterodimerização de dois monômeros de domínio Fc, em que os dois monômeros de domínio Fc contêm mutações de carga inversa diferentes (módulo de selectividade de heterodimerização) (vide, por exemplo, mutações na Tabela 2A) que promovem a formação favorável destes dois monômeros de domínio Fc. Conforme mostrado nas FIGURAS 1 e 2, em um construto de Fc tendo três domínios Fc - um domínio Fc em "haste" carboxila terminal e dois domínios Fc "ramificados" amino terminais - cada um dos domínios Fc "ramificados" amino terminais pode ser um domínio Fc heterodimérico (também chamado de "domínio Fc heterodimérico ramificado") (por exemplo, um domínio Fc heterodimérico formado pelos monômeros de domínio Fc 106 e 114 ou monômeros de domínio Fc 112 e 116 na FIG. 1; um domínio Fc heterodimérico formado pelos monômeros de domínio Fc 206 e 214 ou monômeros de domínio Fc 212 e 216 na FIG. 2). Um domínio Fc heterodimérico ramificado pode ser formado por monômero de domínio Fc que contém E357K e um outro monômero de domínio Fc que contém K370D.

Tabela 2A

Mutação(ões) de carga inversa no domínio constante de anti-corpo C_H3 do monômero de domínio Fc 1	Mutação(ões) de carga inversa no domínio constante de anti-corpo C_H3 do monômero de domínio Fc 2
K409D	D399K
K409D	D399R
K409E	D399K
K409E	D399R
K392D	D399K
K392D	D399R
K392E	D399K

Mutação(ões) de carga inversa no domínio constante de anti-corpo C_H3 do monômero de domínio Fc 1	Mutação(ões) de carga inversa no domínio constante de anti-corpo C_H3 do monômero de domínio Fc 2
K392E	D399R
K370D	E357K
K370D	E357R
K370E	E357K
K370E	E357R
K370D	D356K
K370D	D356R
K370E	D356K
K370E	D356R
K409D, K392D	D399K, E356K
K370E, K409D, K439E	E356K, E357K, D399K

Homodimerização de monômeros de domínio Fc

[00246] A homodimerização de monômeros de domínio Fc pode ser promovida ao introduzir as mesmas mutações de orientação eletrostática (módulos de seletividade de homodimerização) em ambos os monômeros de domínio Fc em uma forma simétrica. Em algumas modalidades, dois monômeros de domínio Fc incluem módulos de seletividade de homodimerização contendo mutações de inversão de carga idênticas em pelo menos duas posições dentro do anel de resíduos carregados na interface entre os domínios C_H3. Ao inverter a carga de ambos os membros dos dois ou mais pares complementares de resíduos nos dois monômeros de domínio Fc, os monômeros de domínio Fc mutantes permanecem complementares aos monômeros de domínio Fc da mesma sequência mutante, mas têm uma menor complementaridade com os monômeros de domínio Fc sem essas mutações. As mutações de orientação eletrostática que podem ser introduzidas em um monômero de domínio Fc para promover sua homodimerização

são mostradas, sem limitações, nas Tabelas 2B e 2C. Em uma modalidade, um domínio Fc inclui dois monômeros de domínio Fc, cada um incluindo os mutantes de carga inversa dupla (Tabela 2B), por exemplo, K409D/D399K. Em uma outra modalidade, um domínio Fc inclui dois monômeros de domínio Fc, cada um incluindo os mutantes inversos quádruplos (Tabela 2C), por exemplo, K409D/D399K/K370D/E357K.

[00247] Por exemplo, em um construto de Fc tendo três domínios Fc, um dos três domínios Fc pode ser formado pela homodimerização de dois monômeros de domínio Fc, conforme promovido pelos efeitos de orientação eletrostática. Um "domínio Fc homodimérico" refere-se a um domínio Fc que é formado pela homodimerização de dois monômeros de domínio Fc, em que os dois monômeros de domínio Fc contêm as mesmas mutações de carga inversa (vide, por exemplo, as mutações nas Tabelas 2B e 2C). Conforme mostrado nas FIGURAS 1 e 2, em um construto de Fc tendo três domínios Fc - um domínio Fc em "haste" carboxila terminal e dois domínios Fc "ramificados" amino terminais - o domínio Fc em "haste" carbóxi terminal pode ser um domínio Fc homodimérico (também chamado de "domínio Fc homodimérico em haste") (por exemplo, um domínio Fc homodimérico formado pelos monômeros de domínio Fc 104 e 110 na FIG. 1; um domínio Fc homodimérico formado pelos monômeros de domínio Fc 204 e 210 na FIG. 2). Um domínio Fc homodimérico com haste pode ser formado por dois monômeros de domínio Fc, cada um contendo os mutantes duplos K409D/D399K.

Tabela 2B

Mutação(ões) de carga inversa no domínio constante de anticorpo C_H3 de cada um dos dois monômeros de domínio Fc em um domínio Fc homodimérico
K409D/D399K
K409D/D399R
K409E/D399K
K409E/D399R
K392D/D399K
K392D/D399R
K392E/D399K
K392E/D399R
K370D/E357K
K370D/E357R
K370E/E357K
K370E/E357R
K370D/D356K
K370D/D356R
K370E/D356K
K370E/D356R

Tabela 2C

Mutação(ões) de carga inversa no domínio constante de anticorpo C_H3 de cada um dos dois monômeros de domínio Fc em um domínio Fc homodimérico	Mutação(ões) de carga inversa no domínio constante de anticorpo C_H3 de cada um dos dois monômeros de domínio Fc em um domínio Fc homodimérico
K409D/D399K/K370D/E357K	K392D/D399K/K370D/E357K
K409D/D399K/K370D/E357R	K392D/D399K/K370D/E357R
K409D/D399K/K370E/E357K	K392D/D399K/K370E/E357K
K409D/D399K/K370E/E357R	K392D/D399K/K370E/E357R
K409D/D399K/K370D/D356K	K392D/D399K/K370D/D356K
K409D/D399K/K370D/D356R	K392D/D399K/K370D/D356R
K409D/D399K/K370E/D356K	K392D/D399K/K370E/D356K
K409D/D399K/K370E/D356R	K392D/D399K/K370E/D356R
K409D/D399R/K370D/E357K	K392D/D399R/K370D/E357K
K409D/D399R/K370D/E357R	K392D/D399R/K370D/E357R
K409D/D399R/K370E/E357K	K392D/D399R/K370E/E357K
K409D/D399R/K370E/E357R	K392D/D399R/K370E/E357R
K409D/D399R/K370D/D356K	K392D/D399R/K370D/D356K
K409D/D399R/K370D/D356R	K392D/D399R/K370D/D356R
K409D/D399R/K370E/D356K	K392D/D399R/K370E/D356K
K409D/D399R/K370E/D356R	K392D/D399R/K370E/D356R
K409E/D399K/K370D/E357K	K392E/D399K/K370D/E357K
K409E/D399K/K370D/E357R	K392E/D399K/K370D/E357R
K409E/D399K/K370E/E357K	K392E/D399K/K370E/E357K
K409E/D399K/K370E/E357R	K392E/D399K/K370E/E357R
K409E/D399K/K370D/D356K	K392E/D399K/K370D/D356K
K409E/D399K/K370D/D356R	K392E/D399K/K370D/D356R
K409E/D399K/K370E/D356K	K392E/D399K/K370E/D356K
K409E/D399K/K370E/D356R	K392E/D399K/K370E/D356R

Mutação(ões) de carga inversa no domínio constante de anticorpo CH3 de cada um dos dois monômeros de domínio Fc em um domínio Fc homodimérico	Mutação(ões) de carga inversa no domínio constante de anticorpo CH3 de cada um dos dois monômeros de domínio Fc em um domínio Fc homodimérico
K409E/D399R/K370D/E357K	K392E/D399R/K370D/E357K
K409E/D399R/K370D/E357R	K392E/D399R/K370D/E357R
K409E/D399R/K370E/E357K	K392E/D399R/K370E/E357K
K409E/D399R/K370E/E357R	K392E/D399R/K370E/E357R
K409E/D399R/K370D/D356K	K392E/D399R/K370D/D356K
K409E/D399R/K370D/D356R	K392E/D399R/K370D/D356R
K409E/D399R/K370E/D356K	K392E/D399R/K370E/D356K
K409E/D399R/K370E/D356R	K392E/D399R/K370E/D356R

[00248] Substituir um resíduo de aminoácido original no domínio constante de anticorpo CH3 por um resíduo de aminoácido diferente pode ser obtido alterando o ácido nucléico que codifica o resíduo de aminoácido original. O limite superior para o número de resíduos de aminoácidos originais que podem ser substituídos é o número total de resíduos na interface dos domínios constantes de anticorpo CH3, dado que a interação suficiente na interface ainda seja mantida. Em alguns casos, o domínio constante de anticorpo CH3 não tem mais do que 16 (por exemplo, não mais do que 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14 ou 16) modificações de aminoácidos únicos.

VII. Peptídeos de Ligação

[00249] Na presente descrição, um peptídeo de ligação é usado para descrever uma ligação ou conexão entre domínios de polipeptídeos ou de proteína e/ou associados a frações não proteicas. Em algumas modalidades, um peptídeo de ligação é uma ligação ou uma conexão entre pelo menos dois monômeros de domínio Fc, para que o peptídeo de ligação se conecte ao terminal C do domínio constante de anticorpo CH3 de um primeiro monômero de domínio Fc ao terminal N do domí-

nio dobradiça de um segundo monômero de domínio Fc, de tal modo que os dois monômeros de domínio Fc são unidos uns aos outros em série em tandem. Em outras modalidades, um peptídeo de ligação é uma ligação entre um monômero de domínio Fc e qualquer outros domínios de proteína que são anexados ao mesmo. Por exemplo, um peptídeo de ligação pode anexar o terminal C do domínio constante de anticorpo C_H3 de um monômero de domínio Fc ao terminal N de um peptídeo ligação a albumina.

[00250] Um peptídeo de ligação pode ser uma ligação covalente simples, por exemplo, uma ligação peptídica, um polímero sintético, por exemplo, um polímero de polietilenoglicol (PEG) ou qualquer tipo de ligação criado a partir de uma reação química, por exemplo, uma conjugação química. No caso em que um peptídeo de ligação é uma ligação peptídica, o grupo de ácido carboxílico no terminal C de um domínio de proteína pode reagir com o grupo amino no terminal N de um outro domínio de proteína em uma reação de condensação para formar uma ligação peptídica. Especificamente, a ligação peptídica pode ser formada a partir de meios sintéticos através de uma reação química orgânica convencional bem conhecida na técnica, ou por produção natural de uma célula hospedeira, em que uma sequência polinucleotídica codifica as sequências de DNA de ambas as proteínas, por exemplo, dois monômeros de domínio Fc, em série em tandem, pode ser diretamente transcrita e traduzida em um polipeptídeo contíguo codificando ambas as proteínas pelas máquinas moleculares necessárias, por exemplo, polimerase de DNA e ribossomo, na célula hospedeira.

[00251] No caso em que um peptídeo de ligação é um polímero sintético, por exemplo, um polímero de PEG, o polímero pode ser acrescido com grupos funcionais químicos reativos em cada extremidade para reagir com os aminoácidos terminais nas extremidades de ligação

de duas proteínas.

[00252] No caso em que um peptídeo de ligação (exceto a ligação peptídica mencionada acima) é feito a partir de uma reação química, os grupos funcionais químicos, por exemplo, amina, ácido carboxílico, éster, azida ou outros grupos funcionais comumente usados na técnica, podem ser ligados sinteticamente ao terminal C de uma proteína e o terminal N de outra proteína, respectivamente. Os dois grupos funcionais podem então reagir através de meios de química sintética para formar uma ligação química, ligando assim as duas proteínas. Tais procedimentos de conjugação química são rotineiros para os versados na técnica.

Espaçador

[00253] Na presente descrição, um peptídeo de ligação entre dois monômeros de domínio Fc pode ser um espaçador de aminoácidos, incluindo 3-200 aminoácidos (por exemplo 3-200, 3-180, 3-160, 3-140, 3-120, 3-100, 3-90, 3-80, 3-70, 3-60, 3-50, 3-45, 3-40, 3-35, 3-30, 3-25, 3-20, 3-15, 3-10, 3-9, 3-8, 3-7, 3-6, 3-5, 3-4, 4-200, 5-200, 6-200, 7-200, 8-200, 9-200, 10-200, 15-200, 20-200, 25-200, 30-200, 35-200, 40-200, 45-200, 50-200, 60-200, 70-200, 80-200, 90-200, 100-200, 120-200, 140-200, 160-200, ou 180-200 aminoácidos)(por exemplo, 3-150, 3-100, 3-60, 3-50, 3-40, 3-30, 3-20, 3-10, 3-8, 3-5, 4-30, 5-30, 6-30, 8-30, 10-20, 10-30, 12-30, 14-30, 20-30, 15-25, 15-30, 18- 22, e 20-30 aminoácidos). Em algumas modalidades, um peptídeo de ligação entre dois monômeros de domínio Fc é um espaçador de aminoácidos contendo pelo menos 12 aminoácidos, tal como 12-200 aminoácidos (por exemplo, 12-200, 12-180, 12-160, 12-140, 12-120, 12-100, 12-90, 12-80, 12-70, 12-60, 12-50, 12-40, 12-30, 12-20, 12-19, 12-18, 12-17, 12-16, 12-15, 12-14, ou 12-13 aminoácidos) (por exemplo, 14-200, 16-200, 18-200, 20-200, 30-200, 40-200, 50-200, 60-200, 70-200, 80-200, 90-200, 100-200, 120-200, 140-200, 160-200, 180-200, ou

190-200 aminoácidos). Em algumas modalidades, um peptídeo de ligação entre dois monômeros de domínio Fc é um espaçador de aminoácidos que contém 12-30 aminoácidos (por exemplo, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 ou 30 aminoácidos). Os espaçadores peptídicos adequados são conhecidos na técnica e incluem, por exemplo, peptídeos de ligação peptídica que contêm resíduos de aminoácidos flexíveis, tais como glicina e serina. Em certas modalidades, um espaçador pode conter motivos, por exemplo, motivos múltiplos ou repetidos, de GS, GGS, GGGGS (SEQ ID N° 1), GGSG (SEQ ID N° 2) ou SGGG (SEQ ID N° 3). Em outras modalidades, um espaçador pode conter 2 a 12 aminoácidos incluindo motivos de GS, por exemplo, GS, GSGS (SEQ ID NO: 4), GSGSGS (ID SEQ NO: 5), GSGSGSGS (SEQ ID NO: 6), GSGSGSGSGS (SEQ ID NO: 7) ou GSGSGSGSGSGS (SEQ ID NO: 8). Em outras modalidades, um espaçador pode conter de 3 a 12 aminoácidos incluindo motivos de GGS, por exemplo, GGS, GGSGGS (SEQ ID NO: 9), GGSGGSGGS (SEQ ID NO: 10) e GGSGGSGGS (SEQ ID NO: 11). Em ainda outras modalidades, um espaçador pode conter de 4 a 20 aminoácidos incluindo motivos de GGSG (SEQID NO: 2), por exemplo, GGSGGGSG (SEQ ID NO: 12), GGSGGGSGGGSG (SEQ ID NO: 13), GGSGGGSGGGSGGGSG (SEQ ID NO: 14) ou GGSGGGSGGGSGGGSGGGSG (SEQ ID NO: 15). Em outras modalidades, um espaçador pode conter motivos de GGGGS (SEQ ID NO: 1), por exemplo, GGGGSGGGGS (SEQ ID NO; 16) ou GGGGSGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 17). Em certas modalidades, um espaçador é SGGSGGSGGGSGGGSGGG (SEQ ID NO: 18).

[00254] Em algumas modalidades, um espaçador entre dois monômeros de domínio Fc contém apenas resíduos de glicina, por exemplo, pelo menos 4 resíduos de glicina (por exemplo, 4-200, 4-180, 4-160, 4-140, 4-40, 4-100, 4-90, 4-80, 4-70, 4-60, 4-50, 4-40, 4-30, 4-20, 4-19,

4-18, 4-17, 4-16, 4-15, 4-14, 4-13, 4-12, 4-11, 4-10, 4-9, 4-8, 4-7, 4-6 ou 4-5 resíduos de glicina) (por exemplo, 4-200, 6-200, 8-200, 10-200, 12-200, 14-200, 16-200, 18-200, 20-200, 30-200, 40-200, 50-200, 60-200, 70-200, 80-200, 90-200, 100-200, 120-200, 140-200, 160-200, 180-200, ou 190-200 resíduos de glicina). Em certas modalidades, um espaçador tem 4-30 resíduos de glicina (por exemplo, 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 ou 30 resíduos de glicina). Em algumas modalidades, um espaçador que contém apenas resíduos de glicina pode não ser glicosilado (por exemplo, glicosilação O-ligada, também referida como O-glicosilação) ou pode ter um nível de glicosilação diminuído (por exemplo, um nível de O-glicosilação diminuído) por exemplo, um nível de O-glicosilação diminuído com glicanos, tais como xilose, manose, ácidos siálicos, fucose (Fuc) e/ou galactose (Gal), por exemplo, xilose), conforme comparado com, por exemplo, um espaçador que contém um ou mais resíduos de serina (por exemplo, SGGGSGGGSGGGSGGGSGGG (SEQ ID NO: 18)) (vide Exemplo 4).

[00255] Em algumas modalidades, um espaçador que contém apenas resíduos de glicina pode não ser O-glicosilado (por exemplo, O-glicosilação) ou pode ter um nível diminuído de O-glicosilação (por exemplo, um nível diminuído de O-glicosilação), conforme comparado a, por exemplo, um espaçador que contém um ou mais resíduos de serina (por exemplo, SGGGSGGGSGGGSGGGSGGG (SEQ ID NO: 18)).

[00256] Em algumas modalidades, um espaçador que contém apenas resíduos de glicina pode não se submeter à proteólise ou pode ter uma taxa de proteólise em comparação com, por exemplo, um espaçador que contém um ou mais resíduos de serina (por exemplo, SGGGSGGGSGGGSGGGSGGG (SEQ ID NO: 18)) (vide Exemplo 4).

[00257] Em certas modalidades, um espaçador pode conter motivos

de GGGG (SEQ ID NO: 19), por exemplo, GGGGGGGGG (SEQ ID NO: 20), GGGGGGGGGGGGGGG (SEQ ID NO: 21), GGGGGGGGGGGGGGGGG (SEQ ID NO: 22) ou GGGGGGGGGGGGGGGGGGG (SEQ ID NO: 23). Em certas modalidades, um espaçador pode conter motivos de GGGGG (SEQ ID NO: 24), por exemplo, GGGGGGGGG (SEQ ID NO: 25) ou GGGGGGGGGGGGGGG (SEQ ID NO: 26). Em certas modalidades, um espaçador é GGGGGGGGGGGGGGGGGGG (SEQ ID NO: 27).

[00258] Em outras modalidades, um espaçador pode também conter aminoácidos que não sejam glicina e serina, por exemplo, GENLYFQSGG (SEQ ID NO: 28), SACYCELS (SEQ ID NO: 29), RSIAT (SEQ ID NO: 30), RPACKIPNDLKQKVMNH (SEQ ID NO: 31), GGSAGGSGSGSSGGSSGTGTAGGTGSGSGTGSG (SEQ ID NO: 32), AAANSSIDLISVPVDSR (SEQ ID NO: 33) ou GGSGGGSEGGGSEGGGSEGGGSEGGGSEGGSGGGS (SEQ ID NO: 34).

[00259] Em certas modalidades na presente descrição, um espaçador peptídico de 12 ou 20 aminoácidos é usado para conectar dois monômeros de domínio Fc em uma série em tandem (por exemplo, os polipeptídeos 102 e 108 na FIG. 1; os polipeptídeos 202 e 208 na FIG. 2), os espaçadores peptídicos de 12 ou 20 aminoácidos consistindo nas sequências GGGSGGGSGGGS (SEQ ID NO: 35) e SGGSGGGSGGSGGGSGGG (SEQ ID NO: 18), respectivamente. Em outras modalidades, um espaçador de peptídeo de 18 aminoácidos que consiste na sequência GGSGGGSGGGSGGGSGGS (SEQ ID NO: 36) pode ser usado.

[00260] Em algumas modalidades, um espaçador entre Fc dois monômeros de domínio Fc pode compreender, consistir em, ou consistir essencialmente em uma sequência que é pelo menos 75% idêntica (por exemplo, pelo menos, 77%, 79%, 81%, 83%, 85%, 87%, 89%,

91%, 93%, 95%, 97%, 99% ou 99.5% idêntica) à sequência de qualquer uma das SEQ ID NOs: 1-36 descritas acima. Em algumas modalidades, um espaçador entre os monômeros de domínio Fc pode compreender, consistir em, ou consistir essencialmente em uma sequência que é qualquer uma das SEQ ID NOs: 1-36 descritas acima com até 10 (por exemplo, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2, ou 1) modificações de aminoácidos únicos (por exemplo, substituições, por exemplo, substituições conservativas). Em certas modalidades, um espaçador entre Fc dois monômeros de domínio Fc pode compreender, consistir em, ou consistir essencialmente em uma sequência que é pelo menos 80% idêntica (por exemplo, pelo menos, 82%, 85%, 87%, 90%, 92%, 95%, 97%, 99% ou 99,5% idêntica) à sequência de qualquer uma das SEQ ID NO: 17, 18, 26 e 27. Em certas modalidades, um espaçador entre os monômeros de domínio Fc pode compreender, consistir em, ou consistir essencialmente em uma sequência que é qualquer uma das SEQ ID NOs: 17, 18, 26 e 27 com até 10 (9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2, ou 1) modificações de aminoácidos únicos (por exemplo, substituições, por exemplo, substituições conservativas). Em certas modalidades, um espaçador entre Fc dois monômeros de domínio Fc pode compreender, consistir em, ou consistir essencialmente em uma sequência que é pelo menos 80% idêntica (por exemplo, pelo menos, 82%, 85%, 87%, 90%, 92%, 95%, 97%, 99% ou 99,5%) à sequência de SEQ ID NO: 18 ou 27. Em certas modalidades, um espaçador entre os monômeros de domínio Fc pode compreender, consistir em, ou consistir essencialmente em uma sequência que é sequência de SEQ ID NOs: 18 ou 27 com até 10 (por exemplo, até 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 ou 1) modificações de aminoácidos únicos (por exemplo, substituições, por exemplo, substituições conservativas).

VIII. Peptídeos de ligação à proteína sérica

[00261] A ligação a peptídeos de proteína sérica pode aprimorar a

farmacocinética de medicamentos proteicos e, em particular, os construtos de Fc descritos neste documento podem ser fundidos com os peptídeos de ligação à proteína sérica.

[00262] Como um exemplo, os peptídeos de ligação à albumina que podem ser usados nos métodos e composições descritos neste documento são geralmente conhecidos na técnica. Em uma modalidade, o peptídeo de ligação à albumina inclui a sequência DCLPRWGCLW (SEQ ID NO: 37). Em algumas modalidades, o peptídeo de ligação à albumina compreende, consiste em, ou consiste essencialmente em uma sequência que é pelo menos 80% idêntica (por exemplo, 80%, 90% ou 100% idênticas) à SEQ ID NO: 37. Em uma modalidade, o peptídeo de ligação à albumina compreende, consiste em, ou consiste essencialmente em uma sequência que é a sequência de SEQ ID NO: 37 com até 10 (9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 ou 1) modificações de aminoácidos únicos (por exemplo, substituições, por exemplo, substituições conservativas).

[00263] Na presente descrição, os peptídeos de ligação à albumina podem ser associados a ao terminal N ou C de certos polipeptídeos no construto de Fc. Em uma outra modalidade, um peptídeo de ligação à albumina pode ser ligado ao terminal C de um ou mais polipeptídeos nos construtos de Fc 1-4 (FIGURAS 1 e 2). Em uma outra modalidade, um peptídeo de ligação à albumina pode ser fundido ao terminal C do polipeptídeo que codifica dois monômeros de domínio Fc ligados em uma série em tandem nos construtos 1-4 (por exemplo, o polipeptídeo 102 e 108 na FIG. 1 e os polipeptídeos 202 e 208 na FIG. 2). Em uma outra modalidade, um peptídeo de ligação à albumina pode ser ligado ao terminal C do monômeros de domínio Fc (por exemplo, os monômeros de domínio Fc 114 e 116 na FIG. 1; os monômeros de domínio Fc 214 e 216 na FIG. 2) que unido ao segundo monômero de domínio Fc no polipeptídeo que codifica os dois monômeros de domí-

nio Fc ligados em uma série em tandem. Os peptídeos de ligação à albumina podem ser geneticamente fundidos aos construtos de Fc ou ligados aos construtos de Fc através de meios químicos, por exemplo, conjugação química. Se desejado, um espaçador pode ser inserido entre o construto de Fc e o peptídeo de ligação à albumina. Sem estar ligado a uma teoria, espera-se que a inclusão de um peptídeo de ligação à albumina em um construto de Fc da descrição possa levar a uma retenção prolongada da proteína terapêutica através de sua ligação à albumina sérica.

IX. Construtos de Fc

[00264] Em geral, a descrição apresenta construtos de Fc tendo domínios Fc (por exemplo, um construto de Fc tendo três domínios Fc). Os mesmos podem ter maior afinidade de ligação e/ou avidez do que um único domínio Fc do tipo selvagem para um receptor de Fc, por exemplo, Fc γ RIIIa. A descrição divulga métodos de manipular aminoácidos na interface de dois domínios constantes de anticorpo C_H3 em interação, de tal modo que os monômeros de domínio Fc de um domínio Fc formam seletivamente um dímero uns com os outros, evitando, portanto, a formação de multímeros ou agregados não desejados. Um construto de Fc inclui um número igual de monômeros de domínio Fc, com cada par de monômeros de domínio Fc formando um domínio Fc. Um construto de Fc inclui, no mínimo, um domínio Fc funcional formado a partir de um dímero de dois monômeros de domínio Fc. Em algumas modalidades, os construtos de Fc descritos neste documento não incluem uma região de reconhecimento de antígeno, por exemplo, um domínio variável (por exemplo, V_H, V_L, uma região hipervariável (HVR) ou uma região determinante de complementariedade (CDR). Em algumas modalidades, os construtos de Fc descritos neste documento incluem uma região de reconhecimento de antígeno, por exemplo, um domínio variável (por exemplo, V_H, V_L, uma HVR) ou

uma CDR.

[00265] Um construto de Fc que contém três domínios Fc podem se formar a partir de quatro polipeptídeos (FIGURAS 1 e 2). Os primeiro e segundo polipeptídeos (por exemplo, os polipeptídeos 102 e 108 na FIG. 1; os polipeptídeos 202 e 208 na FIG. 2) podem ser iguais ou diferentes, assim como podem o terceiro e quarto polipeptídeos (por exemplo, polipeptídeos 114 e 116 na FIG. 1; polipeptídeos 214 e 216 na FIG. 2). Na FIG. 1, o primeiro e o segundo polipeptídeos codificam, ambos, dois monômeros de domínio Fc (por exemplo, os monômeros de domínio Fc 104, 106, 110 e 112) conectados por meio de um peptídeo de ligação em uma série em tandem, em que um monômero de domínio Fc contém substituições de aminoácidos carregadas no domínio constante de anticorpo C_H3 (por exemplo, os monômeros de domínio Fc 104 e 110), enquanto o outro monômero de domínio Fc contém uma protuberância no domínio constante de anticorpo C_H3 (por exemplo, os monômeros de domínio Fc 106 e 112). O terceiro e o quarto polipeptídeos codificam, ambos, um monômero de domínio Fc com uma cavidade (por exemplo, os monômeros de domínio Fc 114 e 116). Um domínio Fc heterodimérico com haste pode ser formado ao combinar os monômeros de domínio Fc 104 e 110, cada um dos quais contém as mesmas mutações de carga inversa em seu domínio constante de anticorpo C_H3 (por exemplo, cada um dos monômeros de domínio Fc 104 e 110 contém D399K e K409D). Um primeiro domínio Fc heterodimérico ramificado pode ser formado ao combinar os monômeros de domínio Fc 106 e 114 (por exemplo, o monômero de domínio Fc 106 contém as protuberâncias manipuladas S354C e T366W e o monômero de domínio Fc 114 contém as cavidades manipuladas Y349C, T366S, L368A e Y409V). Um segundo domínio Fc heterodimérico pode ser formado ao combinar os monômeros de domínio Fc 112 e 116 (por exemplo, o monômero de domínio Fc 112 contém as protuberâncias manipuladas Y349C, T366S, L368A e Y409V).

cias manipuladas S354C e T366W e o monômero de domínio Fc 116 contém as cavidades manipuladas Y349C, T366S, L368A e Y409V).

[00266] Na FIG. 2, o primeiro e o segundo polipeptídeos codificam, ambos, dois monômeros de domínio Fc (por exemplo, os monômeros de domínio Fc 204, 206, 210 e 212) conectados por meio de um peptídeo de ligação em uma série em tandem, em que um monômero de domínio Fc contém substituições de aminoácidos carregadas no domínio constante de anticorpo C_H3 (por exemplo, os monômeros de domínio Fc 204 e 210), enquanto o outro monômero de domínio Fc contém uma protuberância e substituições de aminoácidos carregadas no domínio constante de anticorpo C_H3 (por exemplo, os monômeros de domínio Fc 206 e 212). O terceiro e o quarto polipeptídeos codificam, ambos, um monômero de domínio Fc com uma cavidade e substituições de aminoácidos carregadas (por exemplo, monômeros de domínio Fc 214 e 216). Um domínio Fc heterodimérico com haste pode ser formado ao combinar os monômeros de domínio Fc 204 e 210, cada um dos quais contém as mesmas mutações de carga inversa em seu domínio constante de anticorpo C_H3 (por exemplo, cada um dos monômeros de domínio Fc 204 e 210 contém D399K e K409D). Um primeiro domínio Fc heterodimérico ramificado pode ser formado ao combinar os monômeros de domínio Fc 206 e 214 (por exemplo, o monômero de domínio Fc 206 contém protuberâncias manipuladas S354C e T366W e mutação de carga inversa E357K e o monômero de domínio Fc 214 contém as cavidades manipuladas Y349C, T366S, L368A e Y409V e a mutação de carga inversa K370D). Por exemplo, um segundo domínio Fc heterodimérico pode ser formado ao combinar os monômeros de domínio Fc 212 e 216 (por exemplo, o monômero de domínio Fc 212 contém protuberâncias manipuladas S354C e T366W e mutação inversa E357K e o monômero de domínio Fc 216 contém as cavidades manipuladas Y349C, T366S, L368A e Y409V e

mutação de carga inversa K370D).

[00267] Em outras modalidades, um monômero de domínio Fc contendo (i) pelo menos uma mutação de carga inversa e (ii) pelo menos uma cavidade manipulada ou pelo menos uma protuberância manipulada pode se combinar seletivamente com um outro monômero de domínio Fc contendo (i) pelo menos uma mutação de carga inversa e (ii) pelo menos uma protuberância manipulada ou pelo menos uma cavidade manipulada para formar um domínio Fc. Por exemplo, um monômero de domínio Fc contendo a mutação de carga inversa K370D e as cavidades manipuladas Y349C, T366S, L368A e Y407V e um outro monômero de domínio Fc contendo a mutação de carga inversa E357K e as protuberâncias manipuladas S354C e T366W podem se combinar seletivamente para formar um domínio Fc.

[00268] Em algumas modalidades, em um construto de Fc incluindo: a) um primeiro polipeptídeo tendo a fórmula A-L-B; em que i) A inclui um primeiro monômero de domínio Fc; ii) L é um peptídeo de ligação; e iii) B inclui um segundo monômero de domínio Fc; b) um segundo polipeptídeo tendo a fórmula A'-L'-B'; em que i) A' inclui um terceiro monômero de domínio Fc; ii) L' é um peptídeo de ligação; iii) B' inclui um quarto monômero de domínio Fc; c) um terceiro polipeptídeo que inclui um quinto monômero de domínio Fc; e d) um quarto polipeptídeo que inclui um sexto monômero de domínio Fc; em que B e B' se combinam para formar um primeiro domínio Fc. A e o quinto monômero de domínio Fc se combinam para formar um segundo domínio Fc e a quinta liga do monômero do domínio Fc para dar forma um segundo domínio Fc, e A' e o sexto monômero de domínio Fc se combinam para formar um terceiro domínio Fc. Os exemplos de algumas mutações de aminoácidos que podem ser incorporadas nos monômeros de domínio Fc no construto de Fc são mostrados nas Tabelas 3A-3D. Em algumas modalidades, cada um do o primeiro, segundo, terceiro e

quarto polipeptídeos no construto de Fc não possui lisina C-terminal. Em algumas modalidades, o Asp N-terminal em cada um dos primeiro, segundo, terceiro e quarto polipeptídeos no construto de Fc descrito neste documento sofre mutação para Gln. Em algumas modalidades, cada um dentre L e L' compreende, consiste em, ou consiste essencialmente na sequência GGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGG (SEQ ID NO: 27).

Tabela 3A

Monômero de domínio Fc	Mutações de aminoácidos (cada coluna representa um conjunto de mutações em um construto de Fc com três domínios Fc)																			
A e A'	Protuberância manipulada	S354C T366W	S354C T366W	S354C T366W	S354C T366W	S354C T366W	S354C T366W	S354C T366W	S354C T366W	S354C T366W	S354C T366W	S354C T366W	S354C T366W	S354C T366W	S354C T366W	S354C T366W	S354C T366W	S354C T366W	S354C T366W	
	mutação(ões) de carga inversa	E357K	E357R	E357K	E357K	E357R	E357R	E357K	E357R	E357K	E357R	E357K	E357R	E357K	E357R	E357R	E357K	E357R	E357R	E357R
L e L'	GGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGG (SEQ ID NO: 27)																			
B e B'	mutação(ões) de carga inversa	D399K K409D	D399K K409D	D399R K409D	D399K K409E	D399R K409D	D399K K409E	D399R K409E	D399K K409D	D399K K409D	D399R K409D	D399K K409E	D399R K409D	D399K K409D	D399R K409E	D399K K409E	D399R K409E	D399K K409E	D399R K409E	D399R K409E
	5º e 6º Monômeros de domínio Fc	Cavidade manipulada	Y349C T366S L368A Y407V																	
		mutação(ões) de carga inversa	K370D	K370E																

Tabela 3B

Monômero de domínio Fc	Mutações de aminoácidos (cada coluna representa um conjunto de mutações em um construto de Fc com três domínios Fc)																		
A e A'	Protuberância manipulada	S354C T366W	S354C T366W	S354C T366W	S354C T366W	S354C T366W	S354C T366W	S354C T366W	S354C T366W	S354C T366W	S354C T366W	S354C T366W	S354C T366W	S354C T366W	S354C T366W	S354C T366W	S354C T366W	S354C T366W	S354C T366W
	mutação(ões) de carga inversa	K370D	K370D	K370D	K370D	K370D	K370D	K370D	K370D	K370E									
L e L'	GGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGG (SEQ ID NO: 27)																		
B e B'	mutação(ões) de carga inversa	D399K K409D	D399K K409D	D399R K409D	D399K K409E	D399R K409D	D399K K409E	D399R K409E	D399R K409E	D399K K409D	D399R K409D	D399K K409D	D399R K409E	D399K K409D	D399R K409D	D399K K409E	D399R K409E	D399K K409E	D399R K409E
	5º e 6º Monômeros de domínio Fc	Cavidade manipulada	Y349C T366S L368A Y407V																
	mutação(ões) de carga inversa	E357K	E357R	E357K	E357K	E357R	E357R	E357K	E357R										

Tabela 3C

Monômero de domínio Fc	Mutações de aminoácidos (cada coluna representa um conjunto de mutações em um construto de Fc com três domínios Fc)																			
A e A'	Cavidade manipulada	Y349C T366S L368A Y407V																		
	mutação(ões) de carga inversa	E357K	E357R	E357K	E357K	E357R	E357R	E357K	E357R											
L e L'	GGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGG (SEQ ID NO: 27)																			
B e B'	mutação(ões) de carga inversa	D399K K409D	D399K K409D	D399R K409D	D399K K409E	D399R K409D	D399K K409E	D399R K409E	D399R K409D	D399K K409D	D399R K409D	D399K K409E	D399R K409D	D399K K409D	D399R K409E	D399K K409E	D399R K409E	D399K K409E	D399R K409E	
5º e 6º Monômeros de domínio Fc	Protuberância manipulada	S354C T366W																		
	mutação(ões) de carga inversa	K370D	K370E																	

Tabela 3D

Monômero de domínio Fc	Mutações de aminoácidos (cada coluna representa um conjunto de mutações em um construto de Fc com três domínios Fc)																			
A e A'	Cavidade manipulada	Y349C T366S L368A Y407V																		
	mutação(ões) de carga inversa	K370D	K370E																	
L e L'	GGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGG (SEQ ID NO: 27)																			
B e B'	mutação(ões) de carga inversa	D399K K409D	D399K K409D	D399R K409D	D399K K409E	D399R K409D	D399K K409E	D399R K409E	D399K K409E	D399K K409D	D399R K409D	D399K K409D	D399R K409E	D399K K409D	D399R K409D	D399K K409E	D399R K409E	D399K K409E	D399R K409E	
	mutação(ões) de carga inversa	S354C T366W																		
5º e 6º Monômeros de domínio Fc	Protuberância manipulada	E357K	E357R	E357K	E357K	E357R	E357R	E357K	E357R											
	mutação(ões) de carga inversa																			

[00269] Em algumas modalidades, um construto de Fc contém dois domínios Fc formados por três polipeptídeos. O primeiro polipeptídeo contém dois monômeros de domínio Fc unidos em uma série em tandem por meio de um peptídeo de ligação (por exemplo, um espaçador de glicina; SEQ ID NOs: 26 e 27) e o segundo e o terceiro polipeptídeos contêm um monômero de domínio Fc. O segundo e o terceiro polipeptídeos podem ser o mesmo polipeptídeo ou podem ser polipeptídeos diferentes. A FIG. 13 ilustra um exemplo de tal construto de Fc. O primeiro polipeptídeo (1302) contém dois monômeros de domínio Fc (1304 e 1306) unidos em uma série em tandem por meio de um peptídeo de ligação (por exemplo, um espaçador de glicina; SEQ ID NOs: 26 e 27). Ambos os monômeros de domínio Fc 1304 e 1306 contêm protuberâncias manipuladas nos domínios constantes de anticorpo C_H3. O segundo e o terceiro polipeptídeos (1308 e 1310) contêm, cada um, um monômero de domínio Fc tendo cavidades manipuladas no domínio constante de anticorpo C_H3. Um dos monômeros de domínio Fc (1304) no primeiro polipeptídeo forma um primeiro domínio Fc heterodimérico com o segundo polipeptídeo (1308), enquanto que o outro monômero de domínio Fc (1306) no primeiro polipeptídeo forma um segundo domínio Fc heterodimérico com o terceiro polipeptídeo (1310). O segundo e o terceiro polipeptídeos não estão ligados uns aos outros. A interface protuberância-na-cavidade manipulada C_H3-C_H3 favorece a formação de heterodímeros de monômeros de domínio Fc e evita a formação descontrolada de multímeros indesejados. Em algumas modalidades, cada um dos monômeros de domínio Fc pode conter adicionalmente mutações de carga inversa para promover a heterodimerização. Por exemplo, o monômero de domínio Fc 1304 tendo protuberâncias manipuladas e mutações de carga inversa (por exemplo, E357K) pode formar favoravelmente um domínio Fc heterodimérico com o monômero de domínio Fc 1308 tendo cavidades mani-

puladas e mutações de carga inversa (por exemplo, K370D).

[00270] Em ainda outras modalidades, os construtos de Fc podem conter cinco domínios Fc formados a partir de seis polipeptídeos. Dois exemplos são representados nas FIGURAS 14 e 15. Enquanto estes construtos de Fc representados são compreendidos de seis polipeptídeos, quatro dos polipeptídeos podem ser codificados pelo menos ácido nucleico, e os dois polipeptídeos restantes podem também ser codificados pelo menos ácido nucleico. Como resultado, estes construtos de Fc podem ser produzidos pela expressão de dois ácidos nucleicos em uma célula hospedeira adequada.

[00271] A FIG. 14 é uma ilustração de um construto de Fc contendo cinco domínios Fc formados por seis polipeptídeos. Os primeiro e segundo polipeptídeos (1402 e 1410) contêm, cada um, três monômeros de domínio Fc (1404, 1406, 1408 e 1412, 1414, 1416, respectivamente) ligados em uma série em série por meio de um peptídeo de ligação (por exemplo, um espaçador de glicina; SEQ ID NOs: 26 e 27). Especificamente, no polipeptídeo 1402 ou 1410, um primeiro monômero de domínio Fc contendo uma protuberância (1404 ou 1412) é conectado a um segundo monômero de domínio Fc que contém aminoácidos carregados diferentes na interface C_H3-C_H3 (1406 ou 1414) do que a sequência do tipo selvagem, que é conectada a um terceiro monômero de domínio Fc contendo uma protuberância (1408 ou 1416). Os monômeros de domínio FC 1406 e 1414 podem conter as mesmas mutações de carga inversa (por exemplo, D399K/K409D) que promovem a formação de um domínio Fc heterodimérico. O terceiro ao sexto polipeptídeos (1418, 1420, 1422 e 1424) contêm, cada um, um monômero de domínio Fc contendo uma cavidade e formam um domínio Fc heterodimérico com cada um dos monômeros de domínio Fc 1404, 1408, 1412 e 1416, respectivamente. Em algumas modalidades, cada um dos monômeros de domínio Fc 1404, 1408, 1412, 1416, 1418, 1420,

1422 e 1424 pode conter adicionalmente mutações de carga inversa para promover a heterodimerização. Por exemplo, o monômero de domínio Fc 1408 tendo protuberâncias manipuladas e mutações de carga inversa (por exemplo, E357K) pode formar favoravelmente um domínio Fc heterodimérico com o monômero de domínio Fc 1420 tendo cavidades manipuladas e mutações de carga inversa (por exemplo, K370D).

[00272] A FIG. 15 é uma ilustração de um construto de Fc contendo cinco domínios Fc formados por seis polipeptídeos. Os primeiro e segundo polipeptídeos (1502 e 1510) contêm, cada um, três monômeros de domínio Fc (1504, 1506, 1508 e 1512, 1514, 1516, respectivamente) ligados em uma série em série por meio de um peptídeo de ligação (por exemplo, um espaçador de glicina; SEQ ID NOs: 26 e 27). Especificamente, no polipeptídeo 1502 ou 1510, um primeiro monômero de domínio Fc que contém uma protuberância (1504 ou 1512) é conectado a um segundo monômero de domínio Fc contendo uma protuberância (1506 ou 1514), que é conectado a um terceiro monômero de domínio Fc que contém aminoácidos carregados diferentes na interface C_H3-C_H3 (1508 ou 1516) do que a sequência do tipo selvagem. Os monômeros de domínio FC 1508 e 1516 podem conter as mesmas mutações de carga inversa (por exemplo, D399K/K409D) que promovem a formação de um domínio Fc heterodimérico. O terceiro ao sexto polipeptídeos (1518, 1520, 1522 e 1524) contêm, cada um, um monômero de domínio Fc contendo uma cavidade e formam um domínio Fc heterodimérico com cada um dos monômeros de domínio Fc 1504, 1506, 1512 e 1514, respectivamente. Em algumas modalidades, cada um dos monômeros de domínio Fc 1504, 1506, 1512, 1514, 1518, 1520, 1522 e 1524 pode conter adicionalmente mutações de carga inversa para promover a heterodimerização. Por exemplo, o monômero de domínio Fc 1504 tendo protuberâncias manipuladas e mutações de

carga inversa (por exemplo, E357K) pode formar favoravelmente um domínio Fc heterodimérico com o monômero de domínio Fc 1518 tendo cavidades manipuladas e mutações de carga inversa (por exemplo, K370D).

[00273] A FIG. 16 é uma ilustração de um outro construto de Fc contendo cinco domínios Fc formados por seis polipeptídeos. Os primeiro e segundo polipeptídeos (1602 e 1610) contêm, cada um, três monômeros de domínio Fc (1604, 1606, 1608 e 1612, 1614, 1616, respectivamente) ligados em uma série em série por meio de um peptídeo de ligação (por exemplo, um espaçador de glicina; SEQ ID NOs: 26 e 27). Especificamente, no polipeptídeo 1602 ou 1610, um primeiro monômero de domínio Fc que contém aminoácidos carregados diferentes na interface C_H3-C_H3 (1604 ou 1612) está conectado a um segundo monômero de domínio Fc que contém protuberância (1606 ou 1614), que está conectado a um terceiro monômero de domínio Fc contendo uma protuberância (1608 ou 1616) do que a sequência do tipo selvagem. Os monômeros de domínio FC 1604 e 1612 podem conter as mesmas mutações de carga inversa (por exemplo, D399K/K409D) que promovem a formação de um domínio Fc heterodimérico. O terceiro ao sexto polipeptídeos (1618, 1620, 1622 e 1624) contêm, cada um, um monômero de domínio Fc contendo uma cavidade e formam um domínio Fc heterodimérico com cada um dos monômeros de domínio Fc 1606, 1608, 1614 e 1616, respectivamente. Em algumas modalidades, cada um dos monômeros de domínio Fc 1606, 1608, 1614, 1616, 1618, 1620, 1622 e 1624 pode conter adicionalmente mutações de carga inversa para promover a heterodimerização. Por exemplo, o monômero de domínio Fc 1608 tendo protuberâncias manipuladas e mutações de carga inversa (por exemplo, E357K) pode formar favoravelmente um domínio Fc heterodimérico com o monômero de domínio Fc 1620 tendo cavidades manipuladas e

mutações de carga inversa (por exemplo, K370D).

[00274] Em uma outra modalidade, um construto de Fc que contém dois ou mais domínios Fc pode ser formado a partir de dois polipeptídeos tendo a mesma sequência primária. Tal construto pode ser formado a partir da expressão de uma sequência de polipeptídeo única em uma célula hospedeira. Um exemplo é representado na FIG. 17. Neste exemplo, um único ácido nucleico é suficiente para codificar um construto de Fc que contém três domínios Fc. Dois monômeros de domínio Fc que fazem parte do mesmo polipeptídeo são permitidos formar um domínio Fc heterodimérico pela inclusão de um peptídeo de ligação flexível de um comprimento e flexibilidade suficientes. Este mesmo polipeptídeo também contém um terceiro monômero de domínio Fc unido por meio de um peptídeo de ligação flexível (por exemplo, um espaçador de glicina; SEQ ID NOs: 26 e 27). Este terceiro monômero de domínio Fc (1708) é capaz de se juntar a um outro monômero de domínio Fc (1716) para formar um domínio Fc homodimérico e para produzir um construto de Fc em formato de Y representado na FIG. 17. A formação de domínios Fc pode ser controlada com o uso de módulos de seletividade de dimerização, conforme também representado na FIG. 17. Em algumas modalidades, cada um dos monômeros de domínio Fc 1704, 1706, 1712 e 1714 pode conter adicionalmente mutações de carga inversa para promover a heterodimerização. Por exemplo, o monômero de domínio Fc 1704 tendo protuberâncias manipuladas e mutações de carga inversa (por exemplo, E357K) pode formar favoravelmente um domínio Fc heterodimérico com o monômero de domínio Fc 1706 tendo cavidades manipuladas e mutações de carga inversa (por exemplo, K370D).

[00275] Em algumas modalidades, um ou mais polipeptídeos de Fc em um construto de Fc (por exemplo, o construto de Fc 1-3 na FIG. 1; o construto de Fc 4 na FIG. 2) não possuem um resíduo de lisina C-

terminal. Em algumas modalidades, todos os polipeptídeos de Fc em um construto de Fc não possuem um resíduo de lisina C-terminal. Em algumas modalidades, a ausência de uma lisina C-terminal em um ou mais polipeptídeos de Fc em um construto de Fc pode aprimorar a homogeneidade de uma população de um construto de Fc (por exemplo, um construto de Fc tendo três domínios Fc), por exemplo, uma população de um construto de Fc tendo três domínios Fc que é substancialmente homogênea (vide Exemplo 8). Em um exemplo, o resíduo de lisina C-terminal em um polipeptídeo de Fc tendo a sequência de qualquer uma das SEQ ID NOs: 43 e 44 (vide Exemplo 1, Tabela 6) e pode ser removido para gerar um polipeptídeo de Fc correspondente que não contenha um resíduo de lisina C-terminal.

[00276] Em algumas modalidades, um monômero de domínio Fc em um construto de Fc descrito neste documento (por exemplo, um construto de Fc tendo três domínios Fc) pode compreender, consistir em, ou consistir essencialmente em uma sequência que seja pelo menos 95% idêntica (por exemplo, pelo menos 97%, 99%, ou 99,5% idêntica) à sequência de um monômero de domínio Fc do tipo selvagem (por exemplo, SEQ ID NO: 42). Em algumas modalidades, um monômero de domínio Fc em um construto de Fc descrito neste documento (por exemplo, um construto de Fc tendo três domínios Fc) pode compreender, consistir, ou consistir essencialmente em uma sequência que seja a sequência de um monômero de domínio Fc de tipo selvagem (SEQ ID NO: 42) com até 10 (9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2, ou 1) modificações de aminoácidos únicos (por exemplo, substituições, por exemplo, substituições conservativas). Em algumas modalidades, um monômero de domínio Fc em um construto de Fc descrito neste documento (por exemplo, um construto de Fc tendo três domínios Fc) pode compreender, consistir em, ou consistir essencialmente em uma sequência que seja pelo menos 95% idêntica (por exemplo, pelo menos 97%,

99%, ou 99,5% idêntica) à sequência de qualquer uma das SEQ ID NOs: 44, 46, 48, e 50-53. Em algumas modalidades, um monômero de domínio Fc em um construto de Fc descrito neste documento (por exemplo, um construto de Fc tendo três domínios Fc) pode compreender, consistir em, ou consistir essencialmente em uma sequência que seja a sequência de qualquer uma das SEQ ID NOs: 44, 46, 48 e 50-53 com até 10 (9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2, ou 1) modificações de aminoácidos únicos (por exemplo, substituições, por exemplo, substituições conservativas). Em certas modalidades, um monômero de domínio Fc no construto de Fc pode compreender, consistir em, ou consistir essencialmente em uma sequência que seja pelo menos 95% idêntica (por exemplo, pelo menos 97%, 99%, ou 99,5% idêntica) à sequência da SEQ ID NO: 48, 52, e 53. Em certas modalidades, um monômero de domínio Fc no construto de Fc pode compreender, consistir em, ou consistir essencialmente em uma sequência que seja a sequência de SEQ ID NO: 48, 52, e 53 com até 10 (por exemplo, até 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2, ou 1) modificações de aminoácidos únicos (por exemplo, substituições, por exemplo, substituições conservativas).

[00277] Em algumas modalidades, um polipeptídeo tendo dois monômeros de domínio Fc em um construto de Fc descrito neste documento (por exemplo, polipeptídeos 102 e 108 na FIG. 1; polipeptídeos 202 e 208 na FIG. 2) pode compreender, consistir em, ou consistir essencialmente em uma sequência que seja pelo menos 95% idêntica (por exemplo, pelo menos 97%, 99%, ou 99,5% idêntica) à sequência de qualquer uma das SEQ ID NOs: 43, 45, 47 e 49 (vide Exemplo 1, Tabela 6). Em algumas modalidades, um polipeptídeo tendo dois monômeros de domínio Fc em um construto de Fc descrito neste documento (por exemplo, polipeptídeos 102 e 108 na FIG. 1; polipeptídeos 202 e 208 na FIG. 2) pode compreender, consistir em, ou consistir essencialmente em uma sequência que seja a sequência de qualquer

uma das SEQ ID NOs: 43, 45, 47, e 49 (vide o Exemplo 1, Tabela 6) com até 10 (9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2, ou 1) modificações de aminoácido único (por exemplo, substituições, por exemplo, substituições conservativas). Em certas modalidades, um polipeptídeo tendo dois monômeros de domínio Fc em um construto de Fc descrito neste documento pode compreender, consistir em, ou consistir essencialmente em uma sequência que seja pelo menos 95% idêntica (por exemplo, pelo menos 97%, 99%, ou 99,5% idêntica) à sequência de SEQ ID NOs: 49. Em certas modalidades, um polipeptídeo tendo dois monômeros de domínio Fc em um construto de Fc descrito neste documento pode compreender, consistir em, ou consistir essencialmente em uma sequência que seja a sequência de SEQ ID NOs: 49 com até 10 (por exemplo, até 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 ou 1) modificações de aminoácidos únicos (por exemplo, substituições, por exemplo, substituições conservativas). Em algumas modalidades, as mutações de aminoácidos em um polipeptídeo tendo dois monômeros de domínio Fc em um construto de Fc descritas neste documento (por exemplo, os polipeptídeos 102 e 108 na FIG. 1; os polipeptídeos 202 e 208 na FIG. 2) ocorrem apenas nos monômeros de domínio Fc (por exemplo, os monômeros de domínio Fc 104, 106, 110 e 112 na FIG. 1; os monômeros de domínio Fc 204, 206, 210 e 212 na FIG. 2) e não ocorrem no espaçador. Por exemplo, nos polipeptídeos apresentados na Tabela 8, as mutações de aminoácidos adicionais podem ser feitas nos monômeros de domínio Fc tendo as sequências de SEQ ID NOs: 50-53, enquanto os espaçadores tendo as sequências da SEQ ID NOs: 18, 26 e 27 não mudam.

[00278] Em algumas modalidades, o Asp N-terminal em um ou mais do primeiro, do segundo, do terceiro e do quarto polipeptídeos em um construto de Fc descritos neste documento (por exemplo, os polipeptídeos 102, 108, 114 e 116 na FIG. 1; 202, 208, 214 e 216 na FIG. 2)

pode ter mutação para Gln. Em algumas modalidades, o Asp N-terminal em cada um dentre o primeiro, segundo, terceiro e quarto polipeptídeos em um construto de Fc descrito neste documento sofre mutação para Gln. Em outras modalidades, um construto de Fc descrito neste documento (por exemplo, um construto de Fc tendo três domínios Fc) pode incluir um ou mais monômeros de domínio Fc tendo Asp N-terminal tendo mutação para Gln. Em algumas modalidades, a mutação de Asp N-terminal para Gln em um ou mais do primeiro, do segundo, do terceiro e do quarto polipeptídeos em um construto de Fc descritos neste documento podem aprimorar a homogeneidade de uma população de um construto de Fc (por exemplo, um construto de Fc tendo três domínios Fc), por exemplo, uma população de um construto de Fc tendo três domínios Fc que é substancialmente homogênea. Por exemplo, a Tabela 4 mostra as sequências de aminoácidos de primeira, segunda, terceiros e quarto polipeptídeos que têm Asp N-terminal com mutação para Gln em um construto de Fc tendo três domínios Fc.

Tabela 4

Construto de Fc com Asp N-terminal com mutação para Gln em todos os quatro polipeptídeos	
Primeiro e segundo polipeptídeos	QKTHTCPPCPAPELLGGPSVLFPPKPKDTLMISRTPEVT CVVVDVSHEDEPVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNS TYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISK AKGQPREPQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDI AVEWESNGQ PENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSR WQQGVNFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKSGGGSG GGSGGGSGGGSGGGDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFP PKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDEPVKFNWYVDGVE VHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCK VSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQ VSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQ PENNYKTTPPVLKSD GSFFLYSDLTVDKSRWQQGVNFSCSVMHEALHNHYTQK SLSLSPGK (SEQ ID NO: 54)
Terceiro e quarto polipeptídeos	QKTHTCPPCPAPELLGGPSVLFPPKPKDTLMISRTPEVT CVVVDVSHEDEPVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNS TYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISK AKGQPREPQVCTLPPSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIA VEWESNGQ PENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRW QQGVNFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 55)
Construto de Fc com Asp N-terminal com mutação para Gln em todos os quatro polipeptídeos	
Primeiro e segundo polipeptídeos	QKTHTCPPCPAPELLGGPSVLFPPKPKDTLMISRTPEVT CVVVDVSHEDEPVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNS TYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISK AKGQPREPQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDI AVEWESNGQ PENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSR WQQGVNFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKSGGGSG GGSGGGSGGGSGGGDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFP PKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDEPVKFNWYVDGVE VHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCK VSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQ VSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQ PENNYKTTPPVLKSD GSFFLYSDLTVDKSRWQQGVNFSCSVMHEALHNHYTQK SLSLSPG (SEQ ID NO: 56)

Terceiro e quarto polipeptídeos	QKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVT CVVVDVSHEDEPVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNS TYRVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISK AKGQPREPQVCTLPPSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIA VEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRW QQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG (SEQ ID NO: 57)
Construto de Fc com Asp N-terminal com mutação para Gln em todos os quatro polipeptídeos	
Primeiro e segundo polipeptídeos	QKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVT CVVVDVSHEDEPVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNS TYRVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISK AKGQPREPQVYTLPPCRDKLTKNQVSLWCLVKGFYPSDI AVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSR WQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKGGGGGGG GGGGGGGGGGDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKD TLMISRTPEVTCVVVDVSHEDEPVKFNWYVDGVEVHNAK TKPREEQYNSTYRVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKA LPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCL VKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVVLKSDGSFFLY SDLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSP G (SEQ ID NO: 58)
Terceiro e quarto polipeptídeos	QKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVT CVVVDVSHEDEPVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNS TYRVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISK AKGQPREPQVCTLPPSRDELTKNQVSLSCAVDGFYPSDI AVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSR WQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG (SEQ ID NO: 59)
Construto de Fc com Asp N-terminal com mutação para Gln em todos os quatro polipeptídeos	
Primeiro e segundo polipeptídeos	QKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVT CVVVDVSHEDEPVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNS TYRVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISK AKGQPREPQVYTLPPCRDKLTKNQVSLWCLVKGFYPSDI AVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSR WQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKGGGGGGG GGGGGGGGGGGGDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLF PPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDEPVKFNWYVDGV EVHNAKTKPREEQYNSTYRVSVLTVLHQDWLNGKEYKC KVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKN QVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVVLKS DGSFFLYSDLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQ KSLSLSPG (SEQ ID NO: 60)

Terceiro e quarto polipeptídeos	QKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVT CVVVDVSHEDEPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNS TYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTI SK AKGQPREPQVCTLPPSRDELTKNQVSLSCAVDGFYPSDI AVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSR WQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG (SEQ ID NO: 59)
---------------------------------	---

X. Produção de células hospedeiras e de proteína

[00279] Na presente descrição, uma célula hospedeira se refere a um veículo que inclui os componentes celulares necessários, por exemplo, organelas, para expressar polipeptídeos e construtos descritos neste documento a partir de seus ácidos nucleicos correspondentes. Os ácidos nucleicos podem ser incluídos em vetores de ácido nucleico que podem ser introduzidos na célula hospedeira por técnicas convencionais conhecidas na técnica (transformação, transfecção, eletroporação, precipitação de fosfato de cálcio, microinjeção direta, etc.). As células hospedeiras podem ser de origem de mamíferos, bacte riana, de fungos ou de insetos. As células hospedeiras de mamíferos incluem, mas não estão limitadas a, CHO (ou cepas de células derivadas de CHO, por exemplo, CHO-K1, CHO-DXB11 CHO-DG44), células hospedeiras murinas (por exemplo, NS0, Sp2/0), VERY, HEK. (por exemplo, HEK293), BHK, HeLa, COS, MDCK, 293, 3T3, W138, BT483, Hs578T, HTB2, BT20 e T47D, CRL7O3O e células HsS78Bst. Também podem ser escolhidas células hospedeiras que modulem a expressão dos construtos proteicos, ou modifiquem e processem o produto proteico da maneira específica desejada. Células hospedeiras diferentes têm características e mecanismos específicos para o processamento pós-traducional e modificação de produtos proteicos. As linhas de célula apropriadas ou sistemas hospedeiros podem ser escolhidos para garantir a correta modificação e processamento da proteína expressa.

[00280] Para a expressão e secreção de produtos proteicos a partir

de seus construtos plasmidiais de DNA correspondentes, as células hospedeiras podem ser transfectadas ou transformadas com DNA controlado por elementos de controle de expressão adequados conhecidos na técnica, incluindo o promotor, potencializador, sequências, extermidores de transcrição, sítios de poliadenilação e marcadores selecionáveis. Os métodos para a expressão de proteínas terapêuticas são conhecidos na técnica. Vide, por exemplo, Paulina Balbas, Argelia Lorence (eds.*Recombinant Gene Expression: Reviews and Protocols (Methods in Molecular Biology)*), Humana Press; 2^a ed. edição de 2004 (20 de julho de 2004)Vladimir Voynov e Justin A. Caravela (eds.*Therapeutic Proteins: Methods and Protocols (Methods in Molecular Biology)*) Humana Press; 2^a ed. edição de 2012 (28 de junho de 2012).

XI. Purificação

[00281] Um construto de Fc pode ser purificado por qualquer método conhecido na técnica de purificação proteica, por exemplo, por cromatografia (por exemplo, troca de íons, afinidade (por exemplo, afinidade de Proteína A) e cromatografia em coluna por exclusão de tamanho), centrifugação, solubilidade diferenciada ou por qualquer outra técnica-padrão para a purificação de proteínas. Por exemplo, um construto de Fc pode ser isolado e purificado adequadamente selecionando e combinando colunas de afinidade como coluna da Proteína A com colunas de cromatografia, filtração, ultra filtração, procedimentos de "salting-out" e de diálise (vide, por exemplo, *Process Scale Purification of Antibodies*, UweGottschalk (ed.) John Wiley & Sons, Inc., 2009; e Subramanian (ed. *Antibodies-Volume I-Production and Purification*, Kluwer Academic/Plenum Publishers, Nova Iorque (2004)).

[00282] Em alguns exemplos, um construto de Fc pode ser conjugado a um ou mais peptídeos de purificação para facilitar a purificação e isolamento do construto de Fc a partir de, por exemplo, toda a mistu-

ra de lisado celular. Em algumas modalidades, o peptídeo de purificação se liga a outra fração que tenha uma afinidade específica pelo peptídeo de purificação. Em algumas modalidades, essas frações que se ligam especificamente ao peptídeo de purificação estão ligadas a um suporte sólido, tal como uma matriz, uma resina, ou esferas de agarose. Os exemplos de peptídeos de purificação que podem ser unidos a um construto de Fc incluem, mas não estão limitados a, peptídeos de hexa-histidina, um peptídeo FLAG, um peptídeo myc e um peptídeo de hemaglutinina (HA). Um peptídeo de hexa-histidina (HHHHHH (SEQ ID NO: 38)) se liga à coluna de afinidade de agarose funcionalizada com níquel com afinidade micromolecular. Em algumas modalidades, um peptídeo FLAG inclui a sequência DYKDDDDK (SEQ ID NO: 39). Em algumas modalidades, um peptídeo FLAG inclui múltiplos inteiros da sequência DYKDDDDK na série em tandem, por exemplo, 3xDYKDDDDK. Em algumas modalidades, um peptídeo myc inclui a sequência EQKLISEEDL (SEQ ID NO: 40). Em algumas modalidades, um peptídeo myc inclui múltiplos inteiros da sequência EQKLISEEDL na série em tandem, por exemplo, 3xEQKLISEEDL. Em algumas modalidades, um peptídeo HA inclui a sequência YPYDVPDYA (SEQ ID NO: 41). Em algumas modalidades, um peptídeo HA inclui múltiplos inteiros da sequência YPYDVPDYA na série em tandem, por exemplo, 3xYPYDVPDYA. Os anticorpos que especificamente reconhecem e se ligam ao peptídeo de purificação FLAG, myc ou HA são bem conhecidos na técnica e geralmente estão comercialmente disponíveis. Um suporte sólido (por exemplo, uma matriz, uma resina ou grânulos de agarose) funcionalizado com estes anticorpos pode ser usado para purificar um construto de Fc que inclui um peptídeo FLAG, myc ou HA.

[00283] Para os construtos de Fc, a cromatografia em coluna de Proteína A pode ser empregada como um processo de purificação. Os

ligantes de Proteína A interagem com os construtos de Fc através da região Fc, tornando a cromatografia de Proteína A um processo de captura altamente seletivo que é capaz de remover a maior parte das proteínas de célula hospedeira. Na presente descrição, os construtos de Fc podem ser purificados usando a cromatografia por coluna de Proteína A, conforme descrito no Exemplo 2.

XII. Composições/preparações farmacêuticas

[00284] A descrição apresenta composições farmacêuticas que incluem um ou mais construtos de Fc descritos neste documento. Em uma modalidade, uma composição farmacêutica inclui uma população substancialmente homogênea dos construtos de Fc. Em vários exemplos, a composição farmacêutica inclui uma população substancialmente homogênea de qualquer um dos construtos 1-4.

[00285] Um construto de proteína terapêutica, por exemplo, um construto de Fc descrito neste documento (por exemplo, um construto de Fc tendo três domínios Fc), da presente descrição pode ser incorporado em uma composição farmacêutica. As composições farmacêuticas que incluem proteínas terapêuticas podem ser formuladas por métodos conhecidos pelos versados na técnica. A composição farmacêutica pode ser administrada parentericamente na forma de uma formulação injetável incluindo uma solução ou suspensão estéril em água ou outro líquido farmaceuticamente aceitável. Por exemplo, a composição farmacêutica pode ser formulada combinando apropriadamente construto de Fc com veículos farmaceuticamente aceitáveis ou meios, como água estéril para injeção (WFI), soro fisiológico, emulsionante, agente de suspensão, tensoativo, estabilizador, diluente, ligante, excipiente, seguidos de mistura em forma de dose de unidade necessária para práticas farmacêuticas geralmente aceitas. A quantidade de ingrediente ativo incluído nas preparações farmacêuticas é tal que uma dose apropriada dentro da faixa designada é fornecida.

[00286] A composição estéril para injeção pode ser formulada em conformidade com práticas farmacêuticas convencionais usando água destilada para injeção como um veículo. Por exemplo, o soro fisiológico ou uma solução isotônica contendo glicose e outros suplementos tais como D-sorbitol, D-manoze, D-manitol e cloreto de sódio podem ser usados como uma solução aquosa para injeção, opcionalmente em combinação com um agente solubilizante adequado, por exemplo, álcool tal como etanol e polialcool tal como propilenoglicol ou polietilenoglicol, e um tensoativo não iônico, tal como polissorbato 80TM, HCO-50 e semelhantes comumente conhecidos na técnica. Os métodos de formulação para os produtos proteicos terapêuticos são conhecidos na técnica, vide por exemplo, Banga (ed.) *Therapeutic Peptides and Proteins: Formulation, Processing and Delivery Systems* (2d ed.) Taylor & Francis Group, CRC Press (2006).

XIII. Dosagem

[00287] As composições farmacêuticas são administradas de uma forma compatível com a formulação de dosagem e em uma quantidade tal como é terapeuticamente eficaz para resultar em uma melhoria ou remediação dos sintomas. As composições farmacêuticas são administradas em uma variedade de formas de dosagem, por exemplo, formas de dosagem intravenosas, formas de dosagem subcutâneas, formas de dosagem orais, tais como soluções ingeríveis, cápsulas de liberação de fármacos e semelhantes. A dosagem apropriada para o sujeito individual depende dos objetivos terapêuticos, a via de administração e a condição do paciente. Geralmente, as proteínas recombinantes são dosadas em 1-200 mg/kg, por exemplo, 1-100 mg/kg, por exemplo, 20-100 mg/kg. Em conformidade, será necessário que um médico adeque e meça a concentração da dosagem e modifique a via de administração conforme necessário para obter o efeito terapêutico ideal.

XIV. Indicações

[00288] As composições farmacêuticas da descrição (por exemplo, aqueles que contêm os construtos de Fc tendo 2, 3 ou 4 domínios Fc) são úteis para reduzir a inflamação em um sujeito, para promover a depuração de autoanticorpos em um sujeito, para suprimir a apresentação de抗ígenos em um sujeito, para reduzir uma resposta imune, por exemplo, bloquear uma ativação baseada em um imunocomplexo da resposta imune em um sujeito e para tratar condições ou doenças imunológicas e inflamatórias em um sujeito. As condições e doenças exemplificativas incluem artrite reumatoide (AR); lúpus eritematoso sistêmico (LES); vasculites associadas ao ANCA; síndrome do anticorpo antifosfolipídeo, anemia hemolítica autoimune; neuropatia desmielinizante inflamatória crônica; depuração de aloanticorpos em transplantados, autoanticorpos na GVHD, anticorpos de reposição, terapêuticos IgG, paraproteínas IgG; dermatomiosite; Síndrome de Goodpasture; síndromes de hipersensibilidade do tipo II do órgão direcionada ao sistema mediadas por citotoxicidade mediada por células dependente de anticorpos, por exemplo, síndrome de Guillain-Barré, PDIC, dermatomiosite, síndrome de Felty, rejeição mediada por anticorpo, doença autoimune da tireoide, colite ulcerativa, doença hepática autoimune; púrpura trombocitopênica idiopática; Miastenia Gravis, neuromielite óptica; pênfigo e outros distúrbios bolhosos autoimunes; Síndrome de Sjögren; citopenias autoimunes e outros distúrbios mediados por fagocitose dependente de anticorpos; outras síndromes inflamatórias dependentes de FcR, por exemplo, sinovite, dermatomiosite, vasculite sistêmica, glomerulite e vasculite.

[00289] Em algumas modalidades, as composições farmacêuticas da descrição contendo construtos de Fc com 5-10 domínios Fc também são úteis, por exemplo, para induzir ativação de células imunológicas da resposta imune em um sujeito, aumentar a fagocitose de uma

célula alvo (por exemplo, célula cancerosa ou célula infectada) em um sujeito, tratar doenças, tais como cânceres e infecções em um sujeito. Construtos de Fc e composições farmacêuticas homogêneas da descrição podem se ligar a receptores de Fcγ de ativação (por exemplo, FcγRI, FcγRIIa, FcγRIIc, FcγRIIIa e FcγRIIIb) para induzir uma resposta imune. Construtos de Fc e composições farmacêuticas homogêneas da descrição podem ativar fosforilação por Syk e fluxo de cálcio de monócitos THP-1 primários. Monócitos ativados e seus macrófagos diferenciados têm habilidade para fagocitar ou matar células alvo. A descrição fornece, portanto, métodos de tratamento que podem ser usados para tratar sujeitos que sofrem de doenças e distúrbios, tais como cânceres e infecções. Em algumas modalidades, construtos de Fc e composições farmacêuticas homogêneas aqui descritas podem ser administrados a um sujeito em uma quantidade terapeuticamente eficaz para fagocitar ou matar células cancerosas ou células infectadas no sujeito.

[00290] Cânceres que são receptivos ao tratamento de acordo com os métodos da descrição incluem, entre outros, câncer de bexiga, câncer de pâncreas, câncer de pulmão, câncer de fígado, câncer de ovário, câncer de colón, câncer de estômago, câncer de mama, câncer de próstata, câncer de rim, câncer de testículo, câncer de tireoide, câncer do útero, câncer de reto, um câncer do sistema respiratório, um câncer do sistema urinário, câncer de cavidade oral, câncer de pele, leucemia, sarcoma, carcinoma, carcinoma basocelular, linfoma não Hodgkin, leucemia mieloide aguda (LMA), leucemia linfoide crônica (LLC), leucemia linfoide crônica de células B (LLC-B), mieloma múltiplo (MM), eritroleucemia, carcinoma de células renais, astrocitoma, oligoastrocitoma, câncer de via biliar, coriocarcinoma, câncer do SNC, câncer de laringe, câncer de pulmão de células pequenas, adenocarcinoma, carcinoma de células gigantes (ou de pequenas células), carcinoma de

células escamosas, linfoma anaplásico de células grandes, câncer de pulmão de células não pequenas, neuroblastoma, rhabdomiossarcoma, câncer neuroectodérmico, glioblastoma, carcinoma de mama, melanoma, tumor miofibroblástico inflamatório e tumor de tecidos moles.

[00291] Infecções que são receptivas ao tratamento de acordo com os métodos da descrição incluem, entre outras, uma infecção bacteriana, uma infecção viral, uma infecção fúngica, uma infecção helmíntica e uma infecção protozoária.

[00292] Exemplos de bactérias causadoras de infecção são bem conhecidos na técnica e incluem, mas não estão limitados a, bactérias no gênero *Streptococcus* (por exemplo, *Streptococcus pyogenes*), bactérias no gênero *Escherichia* (por exemplo, *Escherichia coli*), bactérias no gênero *Vibrio* (por exemplo, *Vibrio cholerae*), bactérias no gênero *Enteritis* (por exemplo, *Enteritis salmonella*), bactérias no gênero *Salmonella* (por exemplo, *Salmonella typhi*).

[00293] Exemplo de vírus causadores de infecção são bem conhecidos na técnicas e incluem, mas não estão limitados a, vírus na família Retroviridae (por exemplo, vírus da imunodeficiência humana (HIV)), vírus na família Adenoviridae (por exemplo, adenovírus), vírus na família Herpesviridae (por exemplo, vírus herpes simplex tipos 1 e 2), vírus na família Papillomaviridae (por exemplo, papilomavírus humano (HPV)), vírus na família Poxviridae (por exemplo, varíola), vírus na família Picornaviridae (por exemplo, vírus da hepatite A, poliovírus, rinovírus), vírus na família Hepadnaviridae (por exemplo, vírus da hepatite B), vírus na família Flaviviridae (por exemplo, vírus da hepatite C, vírus da febre amarela, vírus do Nilo Ocidental), vírus na família Togaviridae (por exemplo, vírus da rubéola), vírus na família Orthomyxoviridae (por exemplo, vírus influenza), vírus na família Filoviridae (por exemplo, vírus ebola, vírus de Marburg), e vírus na família Paramyxoviridae (por exemplo, vírus do sarampo, vírus da caxumba).

[00294] Exemplos de fungos causadores de infecção são bem conhecidos na técnica e incluem, mas não estão limitados a, fungos no gênero *Aspergillus* (por exemplo, *Aspergillus fumigatus*, *A. flavus*, *A. terreus*, *A. niger*, *A. candidus*, *A. clavatus*, *A. ochraceus*), fungos no gênero *Candida* (por exemplo, *Candida albicans*, *C. parapsilosis*, *C. glabrata*, *C. guilliermondii*, *C. krusei*, *C. lusitaniae*, *C. tropicalis*), fungos no gênero *Cryptococcus* (por exemplo, *Cryptococcus neoformans*), e fungos no gênero *Fusarium* (por exemplo, *Fusarium solani*, *F. verticillioides*, *F. oxysporum*).

[00295] Exemplos de helmintos incluem, mas não estão limitados a, platelmintos (cestódeos), nematelmintos (nematódeos), fasciolídeos (trematódeos) e monogeneanos.

[00296] Exemplos de protozoários incluem, mas não estão limitados a, protozoários no gênero *Entamoeba* (por exemplo, *Entamoeba histolytica*), protozoários no gênero *Plasmodium* (por exemplo, *Plasmodium falciparum*, *P. malariae*), protozoários no gênero *Giardia* (por exemplo, *Giardia lamblia*), e protozoários no gênero *Trypanosoma* (por exemplo, *Trypanosoma brucei*).

EXEMPLOS

Exemplo 1. Design de Construtos de Fc

[00297] Idealmente, construtos de Fc são manipulados para aumentar eficiências de dobramento, minimizar associação não controlada de subunidades, o que pode criar oligômeros e multímeros com massa molecular alta indesejados, e gerar composições que sejam substancialmente homogêneas. Com tais objetivos em mente, projetamos quatro construtos de Fc (FIGURAS 1 e 2), cada um dos quais inclui um polipeptídeo longo que inclui dois monômeros de domínio Fc separados por um espaçador (polipeptídeos 102 e 108 na FIG. 1 e polipeptídeos 202 e 208 na FIG. 2) e um polipeptídeo curto que inclui um único monômero de domínio Fc (polipeptídeos 114 e 116 na FIG. 1 e poli-

peptídeos 214 e 216 na FIG. 2). Cada um deles é baseado na sequência de IgG1, incluindo a cavidade manipulada, a protuberância manipulada e/ou modificações de orientação eletrostática para controlar a montagem de peptídeos. As sequências de DNA codificando polipeptídeos longos e curtos foram otimizadas para expressão em células de mamífero e clonadas no vetor de expressão de pcDNA3.4 de mamífero. Os construtos de plasmídeo de DNA foram transfetados através de lipossomas em 293 células de rim humano embrionário (HEK). Um total de oito construtos de plasmídeo de DNA foram usados para formar quatro construtos de Fc com três domínios Fc cada um.

[00298] Para cada construto de Fc, os polipeptídeos longos e curtos, quando coexpressos, produzem uma molécula ramificada contendo três domínios Fc, com os monômeros de FC C-terminais dos polipeptídeos longos se associando especificamente uns aos outros para formar um domínio Fc C-terminal, e com os monômeros de Fc N-terminais dos polipeptídeos longos se associando especificamente aos polipeptídeos curtos para formar dois domínios Fc N-terminais. Construtos de Fc 1-4 e seu design são descritos na Tabela 5 e nas FIGURAS 1 e 2. As sequências utilizadas em cada construto de Fc são mostradas na Tabela 6. A Tabela 7 abaixo resume adicionalmente as características dos polipeptídeos longos e curtos em cada um dos construtos 1-4.

Tabela 5

Construto de Fc	nº de Polipeptídeos Longos (SEQ ID NO)	nº de Polipeptídeos Curtos (SEQ ID NO)	Figura
Construto de Fc 1	102 e 108 (SEQ ID NO: 43)	114 e 116 (SEQ ID NO: 44)	FIG. 1
Construto de Fc 2	102 e 108 (SEQ ID NO: 45)	114 e 116 (SEQ ID NO: 46)	FIG. 1
Construto de Fc 3	102 e 108 (SEQ ID NO: 47)	114 e 116 (SEQ ID NO: 48)	FIG. 1
Construto de Fc 4	202 e 208 (SEQ ID NO: 49)	214 e 216 (SEQ ID NO: 48)	FIG. 2

Tabela 6

SEQ ID NO	Sequência de Aminoácidos
SEQ ID NO: 43	DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVT CVVVDVSHEDEPVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNS TYRVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTSK AKGQPREPQVTLPPIRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDI AVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSR WQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKSGGGSG GGSGGGSGGGSGGGDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFP PKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVFKFNWYVDGVE VHNAKTKPREEQYNSTYRVSVLTVLHQDWLNGKEYKCK VSNKALPAPIEKTSKAKGQPREPQVTLPPIRDELTKNQ VSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLKSD GSFFLYSDLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQK SLSLSPGK
SEQ ID NO: 44	DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVT CVVVDVSHEDEPVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNS TYRVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTSK AKGQPREPQVTLPPSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDI AVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSR WQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO	Sequência de Aminoácidos
SEQ ID NO: 45	DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVT CVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNS TYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISK AKGQPREPVYTLPPCRDELTQNQVSLWCLVKGFYPSDI AVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSR WQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKSGGGSG GGSGGGSGGGSGGGDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFP PKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVE VHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCK VSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPVYTLPPSRDELTQNQ VSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVVLKSD GSFFLYSDLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQK SLSLSPG
SEQ ID NO: 46	DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVT CVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNS TYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISK AKGQPREPVQVCTLPPSRDELTQNQVSLSCAVKGFYPSDI AVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSR WQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
SEQ ID NO: 47	DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVT CVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNS TYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISK AKGQPREPVYTLPPCRDKLTQNQVSLWCLVKGFYPSDI AVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSR WQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKGGGGGGG GGGGGGGGDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKD TLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAK TKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKA LPAPIEKTISKAKGQPREPVYTLPPSRDELTQNQVSLTCL VKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVVLKSDGSFFLY SDLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSP G

SEQ ID NO	Sequência de Aminoácidos
SEQ ID NO: 48	DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVT CVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNS TYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISK AKGQPREPQVCTLPPSRDELTKNQVSLSCAVDGFYPSDI AVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSR WQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
SEQ ID NO: 49	DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVT CVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNS TYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISK AKGQPREPQVYTLPPCRDKLTKNQVSLWCLVKGFYPSDI AVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSR WQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKGGGGGGG GGGGGGGGGGGGGGDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLF PPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGV EVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKC KVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKN QVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVVLKS DGSFFLYSDLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQ KSLSLSPG

Tabela 7

	Construto de Fc 1	Construto de Fc 2	Construto de Fc 3	Construto de Fc 4
Espaçador em Polipeptídeo Longo (102/202 e 108/208)	SGGGSGG GSGGSG GGSGGG (SEQ ID NO: 18)	SGGGSGG GSGGSG GGSGGG (SEQ ID NO: 18)	GGGGGGG GGGGGGG G (SEQ ID NO: 26)	GGGGGGG GGGGGGG GGGGGG (SEQ ID NO: 27)
Lisina C-terminal em Polipeptídeo Longo (102/202 e 108/208)?	S	N	N	N

	Construto de Fc 1	Construto de Fc 2	Construto de Fc 3	Construto de Fc 4
Lisina C-terminal em Polipeptídeo Curto (114/214 e 116/216)?	S	N	N	N
Mutações de aminoácido em 106/206 e 108/208	S354C* T366W	S354C T366W	S354C E357K T366W	S354C E357K T366W
Mutações de aminoácido em 104/204 e 110/210	D399K K409D	D399K K409D	D399K K409D	D399K K409D
Mutações de aminoácido em 114/214 e 116/216	Y349C T366S L368A Y407V	Y349C T366S L368A Y407V	Y349C T366S L368A K370D Y407V	Y349C T366S L368A K370D Y407V
Figura	FIG. 1	FIG. 1	FIG. 1	FIG. 2

*As posições das sequências são numeradas de acordo com o sistema de numeração de Kabat (Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, National Institutes of Health, Bethesda, Md., ed 5, 1991).

[00299] Cada um dos polipeptídeos longos 102 e 108 nos construtos de Fc 1-3 (FIG. 1) e polipeptídeos longos 202 e 208 no construto de Fc 4 (FIG. 2) contém dois monômeros de domínio Fc unidos em série em tandem por meio de um espaçador. A Tabela 8 abaixo fornece as sequências dos monômeros de domínio Fc nos polipeptídeos longos e os espaçadores nos construtos de Fc 1-4.

Tabela 8

Polipeptídeos 102/108 do construto de Fc 1	
Monômero de domínio Fc N-terminal	DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEV TCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQY NSTYRVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEK TISKAKGQPREPQVTLPPIRDELTKNQVSLWCLVKGF YPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKL VDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 50)
Espaçador	SGGGSGGGSGGGSGGGSGGG (SEQ ID NO: 18)
Monômero de domínio Fc C-terminal	DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEV TCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQY NSTYRVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEK TISKAKGQPREPQVTLPPIRDELTKNQVSLTCLVKGFY PSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVVLKSDGSFFLYSDLT VDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 51)
Polipeptídeos 102/108 do construto de Fc 2	
Monômero de domínio Fc N-terminal	DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEV TCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQY NSTYRVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEK TISKAKGQPREPQVTLPPIRDELTKNQVSLWCLVKGF YPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKL VDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 50)
Espaçador	SGGGSGGGSGGGSGGGSGGG (SEQ ID NO: 18)
Monômero de domínio Fc C-terminal	DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEV TCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQY NSTYRVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEK TISKAKGQPREPQVTLPPIRDELTKNQVSLTCLVKGFY PSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVVLKSDGSFFLYSDLT VDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG (SEQ ID NO: 52)
Polipeptídeos 102/108 do construto de Fc 3	

Monômero de domínio Fc N-terminal	DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEV TCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQY NSTYRVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEK TISKAKGQPREPQVTLPPICRDQLTKNQVSLWCLVKGF YPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKL VDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 53)
Espaçador	GGGGGGGGGGGGGGGG (SEQ ID NO: 26)
Monômero de domínio Fc C-terminal	DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEV TCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQY NSTYRVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEK TISKAKGQPREPQVTLPPICRDQLTKNQVSLTCLVKGFY PSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVVLKSDGSFFLYSDLT VDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG (SEQ ID NO: 52)
Polipeptídeos 202/208 do construto de Fc 4	
Monômero de domínio Fc N-terminal	DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEV TCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQY NSTYRVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEK TISKAKGQPREPQVTLPPICRDQLTKNQVSLWCLVKGF YPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKL VDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 53)
Espaçador	GGGGGGGGGGGGGGGGGG (SEQ ID NO: 27)
Monômero de domínio Fc C-terminal	DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEV TCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQY NSTYRVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEK TISKAKGQPREPQVTLPPICRDQLTKNQVSLTCLVKGFY PSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVVLKSDGSFFLYSDLT VDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG (SEQ ID NO: 52)

Exemplo 2. Expressão de Construtos de Fc

[00300] As proteínas expressadas foram purificadas a partir do sobrenadante da cultura de células por cromatografia em coluna de afinidade com base em Proteína A, usando uma coluna Poros MabCapture

A (LifeTechnologies). Os construtos de Fc capturados foram lacados com solução salina tamponada de fosfato (lavagem com baixo teor de sal) e eluída com 100 mM de glicina, pH 3. O eluado foi rapidamente neutralizado pela adição de 1 M TRIS pH 7,4 e submetido a filtração estéril através de um filtro de 0,2 µm.

[00301] As proteínas foram adicionalmente fracionadas por cromatografia de troca iônica usando resina Poros XS (Applied Biosciences). A coluna foi pré-equilibrada com MES de 50 mM, pH 6 (tampão A), e a amostra foi eluída com um gradiente de etapa usando MES de 50 mM, cloreto de sódio de 400 mM e pH 6 (tampão B) como tampão de eluição.

[00302] Após a troca iônica, a fração alvo foi trocada por meio de tampão em tampão PBS usando um cartucho de membrana polietersulfona (PES) com cutoff de 10 kDa em um sistema de filtração de fluxo tangencial. As amostras foram concentradas a aproximadamente 30 mg/mL e submetidas à filtração estéril através de um filtro de 0,2 µm.

Exemplo 3. Ensaios Experimentais usados para Caracterizar Construtos de Fc

Cromatografia Líquida com Peptídeos e Glicopeptídeos-MS/MS

[00303] As proteínas foram diluídas a 1 µg/µL em guanidina de 6M (Sigma). Ditiotreitol (DTT) foi adicionado a uma concentração de 10 mM, para reduzir as ligações dissulfeto sob condições de desnaturação a 65 °C por 30 min. Após resfriamento em gelo, as amostras foram incubadas com iodoacetamida (IAM) de 30 mM por 1 h no escuro para alquilação (carbamidometilação) os tióis livres. A proteína foi, então, dialisada através de uma membrana de 10-kDa em tampão de bicarbonato de amônio de 25 mM (pH 7,8) para remover IAM, DTT e guanidina. A proteína foi digerida com tripsina em Barocycler (NEP 2320; Pressure Biosciences, Inc.). A pressão foi ciclada entre 20.000 psi e

pressão ambiente a 37 °C por um total de 30 ciclos em 1 h. A análise de LC-MS/MS dos peptídeos foi realizada em um Sistema de Cromatografia Ultimate 3000 (Dionex) e um Espectrômetro de Massa Q-Exactive (Thermo Fisher Scientific). Os peptídeos foram separados em uma Coluna BEH PepMap (Waters) usando FA 0,1% em água e FA 0,1% em acetonitrila como as fases móveis. O peptídeo de ligação xilosilado isoladamente foi direcionado com base no íon duplamente carregado ($z=2$) m/z 842,5 com uma largura de isolamento quadrupolo de $\pm 1,5$ Da.

Espectrometria de Massa Intacta

[00304] A proteína foi diluída a uma concentração de 2 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ no tampão de execução que consiste em 78,98% de água, 20% de acetonitrila, 1% de ácido fórmico (FA) e 0,02% de ácido trifluoroacético. A separação por cromatografia de exclusão por tamanho foi realizada em duas Zenix-C SEC-300 (Sepax Technologies, Newark, DE) de 2,1 x 350 mm em tandem por um comprimento de coluna total de 700 mm. As proteínas foram eluídas da coluna SEC usando o tampão de execução descrito acima a uma vazão de 80 $\mu\text{L}/\text{min}$. Espectros de massa foram adquiridos em uma espectrometria de massa Q-ToF QSTAR Elite (Applied Biosystems) operada em um modo positivo. As massas neutras abaixo das frações de tamanho individual foram deconvolucionadas usando deconvolução de picos Bayesiana pela soma dos espectros ao longo de todo o comprimento do pico cromatográfico.

Ensaio de Eletroforese Capilar com dodecil sulfato de sodio (CE-SDS)

[00305] As amostras foram diluídas a 1 mg/mL e misturadas com o tampão desnaturante HT Protein Express (PerkinElmer). A mistura foi incubada a 40 °C por 20 min. As amostras foram diluídas com 70 μL de água e transferidas para uma placa de 96 poços. As amostras foram analisadas por um instrumento Caliper GXII (PerkinElmer) equipado com o HT Protein Express LabChip (PerkinElmer). A intensidade

de fluorescência foi usada para calcular a abundância relativa de cada variante de tamanho.

SDS-PAGE não redutor

[00306] As amostras foram desnaturadas em tampão de amostra Laemmli (4% SDS, Bio-Rad) a 95 °C por 10 minutos. As amostras foram executadas em um gel livre de corantes Criterion TGX (4-15% poliacrilamida, Bio-Rad). As bandas de proteína foram visualizadas por iluminação UV ou coloração com azul de Coomassie. Géis foram imagedos pelo Sistema de Imageamento ChemiDoc MP (Bio-Rad). A quantificação de bandas foi realizada usando software ImageLab 4.0.1 (Bio-Rad).

Citotoxicidade Dependente de Complemento (CDC)

[00307] A CDC foi avaliada por um ensaio colorimétrico no qual células Raji (ATCC) foram revestidas com Rituximab diluído serialmente, construto de Fc 4 ou IVIg. O complemento de soro humano (Quidel) foi adicionado a todos os poços a 25% v/v e incubado por 2 h a 37 °C. As células foram incubadas por 12 h a 37 °C após adição de reagente de proliferação celular WST-1 (Roche Applied Science). As placas foram colocadas em um agitador por 2 minutos e absorbância a 450 nm foi medida.

Exemplo 4. O-glicosilação e Proteólise de Resíduos de Serina de Peptídeo de Ligação

O-glicosilação em Resíduos de Serina de Peptídeo de Ligação

[00308] Conforme descrito no Exemplo 1, projetamos os construtos de Fc para aumentar as eficiências de dobramento, para minimizar a associação não controlada de subunidades e para gerar composições para uso farmacêutico que sejam substancialmente homogêneas. Em uma tentativa de atingir tais objetivos, investigamos os peptídeos de ligação diferentes entre os dois monômeros de domínio Fc no polipeptídeo longo (102 e 108 na FIG. 1; 202 e 208 na FIG. 2). O construto

de Fc 1 e o construto de Fc 2 têm, cada um, um peptídeo de ligação serina-glicina (SGGGSGGGSGGGSGGGSGGG (SEQ ID NO: 18)) entre os dois monômeros de domínio Fc no polipeptídeo longo.

[00309] Quando o construto de Fc 2, que contém o peptídeo de ligação SGGGSAGGSAGGSAGGSAGG (SEQ ID NO: 18) entre os dois monômeros de domínio Fc no polipeptídeo longo, foi analisado por LC-MS/MS de peptídeo, foi observada O-xilosilação (FIG. 3). Entretanto, já que os fragmentos y2 a y9 não contêm xilose, a quinta serina no peptídeo de ligação não é O-xilosilada. Pode haver diversos sítios que sejam O-xilosilados, mas cada peptídeo é apenas xilosilado isoladamente. A extensão e localização dessa modificação pós-traducional pode depender da sequência e do sistema de expressão.

[00310] Da mesma forma, a O-xilosilação foi observada em um construto de Fc com dois domínios Fc (o construto de Fc mostrado na FIG. 13) contendo o mesmo peptídeo de ligação (SG₃)₅ (FIG. 4). Foi observada modificação em múltiplos sítios, até duas modificações de xilose em cada peptídeo de ligação. Ademais, o nível de modificação foi variável entre os lotes.

[00311] Após observar O-xilosilação nos resíduos de serina no peptídeo de ligação serina-glicina, investigamos peptídeos de ligação alternativos que continham apenas resíduos de glicina a fim de otimizar ainda mais a sequência de peptídeo de ligação e melhorar a homogeneidade do construto de Fc. Como resultado, um espaçador de glicina foi selecionado para uso no construto de Fc 3 e construto de Fc 4. O construto de Fc 3 tem um espaçador de glicina com 15-mer (GGGGGGGGGGGGGGGG (SEQ ID NO: 26)) entre os dois dos monômeros de domínio Fc no polipeptídeo longo. O construto de Fc 4 tem um espaçador de glicina com 20-mer (GGGGGGGGGGGGGGGGGGGG (SEQ ID NO: 27)) entre os dois dos monômeros de domínio Fc no polipeptídeo longo.

Proteólise em Resíduos de Serina de Peptídeo de Ligação

Tabela 9

Sequência de Peptídeo de Ligação	Taxa de formação de monômeros (%monômero/dia)
G ₈	0,17
G ₁₅	0,21
G ₂₀	0,24
(SG ₄) ₄	0,33
(SG ₃) ₅	0,34

[00313] Além disso, análises por espectrometria de massa dos produtos de Fc monoméricos no construto de Fc 2, com um peptídeo de ligação (SG_3)₅ em cada um dos polipeptídeos 102 e 108, mostraram que os produtos dominantes foram clivados para o lado N-terminal da serina, com todas as serina, exceto a primeira, suscetíveis a proteólise (FIG. 6). Em contraste, os produtos de clivagem do construto de Fc 4, com um espaçador G₂₀ em cada um dos polipeptídeos 202 e 208, não apresentaram especificidade forte para qualquer resíduo de espaçador.

específico (FIG. 7). Em conjunto, tais resultados indicaram que o espaçador de glicina apresentou uma suscetibilidade reduzida a proteólise. Para limitar a proteólise, um espaçador livre de serina pode ser usado, tal como o espaçador G₂₀ usado no construto de Fc 4. O uso de tal espaçador de glicina melhorou consideravelmente a homogeneidade da composição de construto de Fc final.

Exemplo 5. Otimização do Comprimento do Peptídeo de Ligação

[00314] A fim de otimizar ainda mais a homogeneidade, o comprimento do peptídeo de ligação foi explorado pela preparação de variações na sequência do construto de Fc 2 na qual o peptídeo de ligação (SG₃)₅ foi substituído por um espaçador G₈, G₁₅ ou G₂₀. A análise por ensaios *in vitro* indicou que o comprimento do peptídeo de ligação impactou a atividade biológica, provavelmente pela alteração da habilidade do construto de Fc de interagir com os receptores Fcγ.

[00315] Concluiu-se que a inibição da liberação de IL-8 por células THP-1 estimulada por IgG imobilizada em placa depende do comprimento do peptídeo de ligação (FIG. 8). A inibição a concentrações baixas de construto de Fc seguiu a ordem G₈ < G₁₅ < G₂₀, com construto de Fc 2 tendo um espaçador G₂₀ inibindo de forma mais forte a liberação de IL-8 por células THP-1.

[00316] Ademais, foi observado que a inibição do fluxo de cálcio em neutrófilos é dependente do comprimento do peptídeo de ligação (FIG. 9). A inibição seguiu a ordem G₈ < G₁₅ < G₂₀, com construto de Fc 2 tendo o espaçador G₂₀ exibindo a maior inibição do fluxo de cálcio em neutrófilos.

Exemplo 6. Otimização de Heterodimerização por Tecnologia Knob-into-Hole

[00317] Plasmídeos expressando os polipeptídeos longos e curtos do construto de Fc 2 (polipeptídeos 102, 108, 114 e 116 na FIG. 1) ou polipeptídeos longos e curtos do construto de Fc 4 (polipeptídeos 202,

208, 214 e 216 na FIG. 2) foram transfectados em células HEK293. Após sete dias em cultura, as células foram depuradas por centrifugação e sobrenadantes de meios brutos foram separados por SDS-PAGE não redutor (FIG. 10). A análise densitométrica das bandas de proteína visualizadas revelou que o construto de Fc 2 com três domínios Fc e o construto de Fc 4 com três domínios Fc (Fc3) são expressados a níveis semelhantes. Entretanto, os construtos para o construto de Fc 2 expressaram níveis consideravelmente mais altos de espécies de dímero contaminante (Fc2) (FIG. 10). Ambos os conjuntos de construtos expressaram níveis semelhantes de espécies de monômero (Fc1). Bandas adicionais presentes na imagem representam componentes de meios que estão presentes em controles transfectados em simulação.

[00318] Tais resultados indicam que ter ambas as mutações de orientação eletrostática que promovem a heterodimerização e as mutações knob-into-hole que promovem a heterodimerização nas subunidades de "ramificação" (por exemplo, monômeros de domínio Fc 106, 114, 112 e 116 na FIG. 1; monômeros de domínio Fc 206, 214, 212 e 216 na FIG. 2) potencializa a formação de domínio Fc heterodimérico em um construto de Fc, otimiza a formação de um construto de Fc com três domínios Fc e melhora a homogeneidade da composição contendo o construto de Fc.

Exemplo 7. Orientação Eletrostática para Controle de Heterodimerização

[00319] Para minimizar associação fora de registro de subunidades, que gera oligômeros e multímeros com massa molecular alta indesejada, mutações que favorecem a heterodimerização (por exemplo, knobs e holes) foram introduzidas nas subunidades de "ramificação" (por exemplo monômeros de domínio Fc 106, 112, 114 e 116 na FIG. 1; monômeros de domínio Fc 206, 212, 214 e 216 na FIG. 2). Tais

substituição de aminoácidos mantêm a atração de subunidades de knobs (por exemplo, monômeros de domínio Fc 106 e 112 na FIG. 1; monômeros de domínio Fc 206 e 212 na FIG. 2) para os pares (por exemplo, monômeros de domínio Fc 114 e 116 na FIG. 1; monômeros de domínio Fc 214 e 216 na FIG. 2) e, ao mesmo tempo, impedir a associação entre subunidades de knobs. Já que as mutações knobs também inibem a montagem com as sequências Fc de tipo selvagem, questiona-se a necessidade de incluir mutações adicionais para reduzir ainda mais a afinidade das subunidades em "haste" de Fc (por exemplo, monômeros de domínio Fc 104 e 110 na FIG.1; monômeros de domínio Fc 204 e 210 na FIG. 2) para as subunidades de "ramificação" knobs e holes. A fim de abordar essa questão, foi gerado um polipeptídeo longo de construto de Fc contendo uma sequência de monômero de domínio Fc na subunidade em "haste" carboxila terminal e um monômero de domínio Fc carreando mutações na subunidade de "ramificação" amino terminal. O peptídeo curto correspondente foi o monômero de domínio Fc carreando mutações hole. Este construto de Fc é baseado nas sequências dos polipeptídeos no construto de Fc 2, mas tem uma sequência de monômero de domínio Fc do tipo selvagem na subunidade em "haste" carboxila terminal em cada um dos polipeptídeos longos.

[00320] As células HEK293 foram co-transfetadas com plasmídeos que expressam o construto de Fc 2 (que tem mutações de direção elestrostática de homodimerização no monômero de domínio Fc na subunidade em "haste" carboxila terminal em cada um dos polipeptídeos longos; vide a Tabela 5 e 6 no Exemplo 1), ou um construto de Fc baseado no construto de Fc 2, no qual o monômero de domínio Fc na subunidade em "haste" carboxila terminal em cada um dos polipeptídeos longos foi substituído por uma sequência de monômero de domínio Fc do tipo selvagem (SEQ ID NO: 42) (conforme descrito acima).

Após sete dias em cultura, as células foram removidas por centrifugação e os sobrenadantes dos meios brutos foram separados por SDS-PAGE não redutor. As imagens das proteínas coradas revelaram que o construto de Fc sem mutações de orientação eletrostática nas subunidades em "haste" (marcadas como "sem orientação eletrostática" (faixas 1-3) na FIG. 11) continha níveis muito mais altos de monômeros (Fc1) e dímeros (Fc2) do que a contraparte do construto de Fc 2 (marcado "com orientação eletrostática" (faixas 4 e 5) na FIG. 11). Além disso, um número muito maior de bandas de maior peso molecular do que os trímeros pode ser detectado (faixas 1-3 na FIG. 11).

[00321] Esses resultados confirmam que ter mutações de orientação eletrostáticas que promovem a homodimerização nas subunidades em "haste" (por exemplo, monômeros de domínio Fc 104 e 110 na FIG. 1; monômeros de domínio Fc 204 e 210 na FIG. 2) aumenta ainda mais a formação de um domínio Fc homodimérico no construto de Fc, otimiza a montagem de um construto de Fc tendo três domínios Fc, e aumenta a homogeneidade da composição contendo o construto de Fc.

Exemplo 8. Otimização da Heterogeneidade da Composição por Eliminação de Resíduos de Lisina C-Terminais

[00322] O resíduo de lisina C-terminal de imunoglobulinas é altamente conservado por muitas espécies. Em alguns casos, as lisinas C-terminais nos polipeptídeos são removidas pelo maquinário celular durante a produção de proteínas. O objetivo é melhorar ainda mais a uniformidade dos construtos de Fc na composição e obter uma composição mais homogênea contendo um construto de Fc descrito neste documento através da remoção da lisina C-terminal de cada um dos polipeptídeos no construto de Fc. O construto de Fc 2 não contém nenhum resíduo de lisina C-terminal em nenhum de seus polipeptídeos longos (102 e 108; vide o Exemplo 1, Tabelas 5-7; FIG. 1) ou polipeptídeos curtos (114 e 116). A FIG. 12 mostra que a remoção da lisina

C-terminal para gerar o construto de Fc 2 não induziu a citotoxicidade dependendo do complemento (CDC) *in vitro*. Assim, através da remoção do resíduo de lisina C-terminal, fomos capazes de melhorar a homogeneidade da composição farmacêutica com o construto de Fc sem desencadear efeitos colaterais imunológicos adversos.

Exemplo 9. Design de construtos de Fc com modificações de aminoácido de I253 e/ou R292

[00323] Construtos de Fc com uma meia-vida alterada (por exemplo, aumentada) foram projetados com base no construto 4 (**M230**) e incluíram modificações de aminoácidos (por exemplo, mutações únicas ou combinações de mutações) que alteram a afinidade de ligação a FcRn (por exemplo, reduzindo a ligação a FcRn, por exemplo, incluindo uma modificação de aminoácido na posição I253, por exemplo, I253A) e/ou que alteram a afinidade de ligação a Fc γ RIIb (por exemplo, ligação reduzida a Fc γ RIIb, por exemplo, incluindo uma modificação de aminoácido na posição R292, por exemplo, R292P) (FIGURAS 18A-18O).

[00324] Seis construtos de Fc (FIGURAS 2, 18B, 18C, 18L, 18N e 18O) foram preparados, cada um incluindo um polipeptídeo longo incluindo dois monômeros de domínio Fc separados por um espaçador, por exemplo, um peptídeo de ligação inteiramente de glicina, por exemplo, GGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGG (SEQ ID NO: 23) e um polipeptídeo curto que inclui um único monômero de domínio Fc nas posições I253 (por exemplo, I253A) e/ou R292 (por exemplo, R292P). Cada construto de Fc é baseado na sequência Fc de IgG1, incluindo a cavidade manipulada, a protuberância manipulada e/ou modificações de direção eletrostática para controlar a montagem de peptídeos. As sequências de DNA codificando polipeptídeos longos e curtos foram otimizadas para expressão em células de mamífero e clonadas no vetor de expressão de pcDNA3.4 de mamífero. Os construtos de plas-

mídeo de DNA foram transfectados através de lipossomas em 293 células de rim humano embrionário (HEK).

[00325] Para cada construto de Fc, os polipeptídeos longos e curtos, quando co-expressos, produzem uma molécula ramificada contendo três domínios Fc, com os monômeros de FC C-terminais dos polipeptídeos longos se associando especificamente uns aos outros para formar um domínio Fc C-terminal, e com os monômeros de Fc N-terminais dos polipeptídeos longos se associando especificamente aos polipeptídeos curtos para formar dois domínios Fc N-terminais. Construtos de Fc 12-15, 24, 26 e 27 e seus designs são descritos na Tabela 10 e nas FIGURAS 2 e 18B-18O. As sequências utilizadas em cada construto de Fc são mostradas na Tabela 11, em que cada modificação de aminoácido I253A e/ou R292P está em negrito e sublinhada.

[00326] No construto 4, cada um dos polipeptídeos longos contém um monômero de domínio Fc com aminoácidos carregados (D399K e K409D) na interface CH3-CH3 unidos por meio de um peptídeo de ligação a um monômero de domínio Fc contendo uma protuberância (formado pelas modificações S354C e T366W). O monômero de domínio Fc contendo uma protuberância tem uma modificação de aminoácido (E357K) que potencializa a montagem do domínio Fc. Os polipeptídeos curtos têm, cada um, um monômero de domínio Fc contendo uma cavidade (formada pelas modificações Y349C/T366S/L368A/Y407V). Os polipeptídeos curtos também têm uma modificação de aminoácido (K370D) que potencializa a montagem dos domínios Fc. O construto 4 é formado pela expressão de um primeiro e um segundo polipeptídeo tendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 49, e um terceiro e um quarto polipeptídeos tendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 61.

[00327] Construtos 13-27 (FIGURAS 18A-18O) são idênticos ao construto 4, exceto por certas modificações nas posições I253 e/ou

R292, conforme descrito neste documento. O construto 5 é formado pela expressão de um primeiro e um segundo polipeptídeo tendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 62, e um terceiro e um quarto polipeptídeos tendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 61. O construto 6 é formado pela expressão de um primeiro e um segundo polipeptídeo tendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 64, e um terceiro e um quarto polipeptídeos tendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 57. O construto 7 é formado pela expressão de um primeiro e um segundo polipeptídeo tendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 65, e um terceiro e um quarto polipeptídeos tendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 57. O construto 8 é formado pela expressão de um primeiro e um segundo polipeptídeo tendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 66, e um terceiro e um quarto polipeptídeos tendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 61. O construto 9 é formado pela expressão de um primeiro e um segundo polipeptídeo tendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 67, e um terceiro e um quarto polipeptídeos tendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 61. O construto 10 é formado pela expressão de um primeiro e um segundo polipeptídeo tendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 68, e um terceiro e um quarto polipeptídeos tendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 57. O construto 11 é formado pela expressão de um primeiro e um segundo polipeptídeo tendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 69, e um terceiro e um quarto polipeptídeos tendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 57. O construto 12 é formado pela expressão de um primeiro e um segundo polipeptídeo tendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 71, e um terceiro e um quarto polipeptídeos tendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 70. O construto 13 é formado pela expressão de um primeiro e um segundo polipeptídeo tendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 72, e um terceiro e

um quarto polipeptídeos tendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 70. O construto 14 é formado pela expressão de um primeiro e um segundo polipeptídeo tendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 74, e um terceiro e um quarto polipeptídeos tendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 73. O construto 15 é formado pela expressão de um primeiro e um segundo polipeptídeo tendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 75, e um terceiro e um quarto polipeptídeos tendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 73. O construto 16 é formado pela expressão de um primeiro e um segundo polipeptídeo tendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 76, e um terceiro e um quarto polipeptídeos tendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 70. O construto 17 é formado pela expressão de um primeiro e um segundo polipeptídeo tendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 77, e um terceiro e um quarto polipeptídeos tendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 70. O construto 18 é formado pela expressão de um primeiro e um segundo polipeptídeo tendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 78, e um terceiro e um quarto polipeptídeos tendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 73. O construto 19 é formado pela expressão de um primeiro e um segundo polipeptídeo tendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 79, e um terceiro e um quarto polipeptídeos tendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 73.

Tabela 10. Construtos de Fc com modificações de aminoácido de I253 e/ou R292

Construto de Fc	Mutações de Ligação a FcγRIIb¹	Mutações de Ligação a FcRn²	nº de Polipeptídeos Longos (SEQ ID NO)	nº de Polipeptídeos Curtos (SEQ ID NO)	Figura
Construto de Fc 4	Nenhum	Nenhum	1202 e 1208 (SEQ ID NO: 49)	1214 e 1216 (SEQ ID NO: 61)	FIG. 2
Construto de Fc 5	Nenhum	Domínio Fc C-terminal apenas	502 e 508 (SEQ ID NO: 62)	514 e 516 (SEQ ID NO: 61)	FIG. 18A
Construto de Fc 6	Nenhum	Dois domínios Fc N-terminais	602 e 608 (SEQ ID NO: 64)	614 e 616 (SEQ ID NO: 57)	FIG. 18B
Construto de Fc 7	Nenhum	Todos os três domínios Fc	702 e 708 (SEQ ID NO: 65)	714 e 716 (SEQ ID NO: 57)	FIG. 18C
Construto de Fc 8	Domínio Fc C-terminal apenas	Nenhum	802 e 808 (SEQ ID NO: 66)	814 e 816 (SEQ ID NO: 61)	FIG. 18D
Construto de Fc 9	Domínio Fc C-terminal apenas	Domínio Fc C-terminal apenas	902 e 908 (SEQ ID NO: 67)	914 e 916 (SEQ ID NO: 61)	FIG. 18E
Construto de Fc 10	Domínio Fc C-terminal apenas	Dois domínios Fc N-terminais	1002 e 1008 (SEQ ID NO: 68)	1014 e 1016 (SEQ ID NO: 57)	FIG. 18F
Construto de Fc 11	Domínio Fc C-terminal apenas	Todos os três domínios Fc	1102 e 1108 (SEQ ID NO: 69)	1114 e 1116 (SEQ ID NO: 57)	FIG. 18G

Construto de Fc	Mutações de Ligação a FcγRIIb¹	Mutações de Ligação a FcRn²	nº de Polipeptídeos Longos (SEQ ID NO)	nº de Polipeptídeos Curtos (SEQ ID NO)	Figura
Construto de Fc 12	Dois domínios Fc N-terminais	Nenhum	1202 e 1208 (SEQ ID NO: 71)	1214 e 1216 (SEQ ID NO: 70)	FIG. 18H
Construto de Fc 13	Dois domínios Fc N-terminais	Domínio Fc C-terminal apenas	1302 e 1308 (SEQ ID NO: 72)	1314 e 1316 (SEQ ID NO: 70)	FIG. 18I
Construto de Fc 14	Dois domínios Fc N-terminais	Dois domínios Fc N-terminais	1402 e 1408 (SEQ ID NO: 74)	1414 e 1416 (SEQ ID NO: 73)	FIG. 18J
Construto de Fc 15	Dois domínios Fc N-terminais	Todos os três domínios Fc	1502 e 1508 (SEQ ID NO: 75)	1514 e 1516 (SEQ ID NO: 73)	FIG. 18K
Construto de Fc 16	Todos os três domínios Fc	Nenhum	1602 e 1608 (SEQ ID NO: 76)	1614 e 1616 (SEQ ID NO: 70)	FIG. 18L
Construto de Fc 17	Todos os três domínios Fc	Domínio Fc C-terminal apenas	1702 e 1708 (SEQ ID NO: 77)	1714 e 1716 (SEQ ID NO: 70)	FIG. 18M
Construto de Fc 18	Todos os três domínios Fc	Dois domínios Fc N-terminais	1804 e 1808 (SEQ ID NO: 78)	1814 e 1816 (SEQ ID NO: 73)	FIG. 18N
Construto de Fc 19	Todos os três domínios Fc	Todos os três domínios Fc	1904 e 1908 (SEQ ID NO: 79)	1914 e 1916 (SEQ ID NO: 73)	FIG. 18O

Construto de Fc	Mutações de Ligação a FcγRIIb¹	Mutações de Ligação a FcRn²	nº de Polipeptídeos Longos (SEQ ID NO)	nº de Polipeptídeos Curtos (SEQ ID NO)	Figura
¹ Mutação R292P					
² Mutação u1253A					

Tabela 11. Sequências de aminoácidos

	Sequência de Aminoácidos
SEQ ID NO: 61	DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVT CVVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNS TYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISK AKGQPREPQVCTLPPSRDELTKNQVSLSCAVDGFYPSDI AVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSR WQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
SEQ ID NO: 49	DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVT CVVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNS TYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISK AKGQPREPQVYTLPPCRDKLTKNQVSLWCLVKGFYPSDI AVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSR WQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKGGGGGGG GGGGGGGGGGGGDKHTCPPCPAPELLGGPSVFLF PPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGV EVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKC KVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKN QVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVVLKS DGSFFLYSDLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQ KSLSLSPG

	Sequência de Aminoácidos
SEQ ID NO: 62	DKTHTCPPCPAPELLGGPSVLFPPKPKDTLMISRTPEVT CVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNS TYRVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISK AKGQPREPQVTLPPICRDQLTKNQVSLWCLVKGFYPSDI AVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSR WQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKGHHGGGG GGGGGGGGGGGGDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLF PPKPKDTLM <u>A</u> SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDG VEVHNAKTKPREEQYNSTYRVSVLTVLHQDWLNGKEYK CKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVTLPPICRDQLT NQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVVLK SDGSFFLYSDLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYT QKSLSLSPG
SEQ ID NO: 57	DKTHTCPPCPAPELLGGPSVLFPPKPKDTLM <u>A</u> SRTPEVT CVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNS TYRVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISK AKGQPREPQVCTLPPICRDQLTKNQVSLSCAVDGFYPSDI AVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSR WQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
SEQ ID NO: 64	DKTHTCPPCPAPELLGGPSVLFPPKPKDTLM <u>A</u> SRTPEVT CVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNS TYRVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISK AKGQPREPQVTLPPICRDQLTKNQVSLWCLVKGFYPSDI AVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSR WQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKGHHGGGG GGGGGGGGGGGGDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLF PPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDG EVHNAKTKPREEQYNSTYRVSVLTVLHQDWLNGKEYK CKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVTLPPICRDQLT NQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVVLK SDGSFFLYSDLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQ KSLSLSPG

	Sequência de Aminoácidos
SEQ ID NO: 65	DKTHTCPPCPAPELLGGPSVLFPPKPKDTLM <u>A</u> SRTPEVT CVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNS TYRVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISK AKGQPREPQVTLPPICRDKLTKNQVSLWCLVKGFYPSDI AVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSR WQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKGHHHHGG GGGGGGGGGGGGGGDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLF PPKPKDTLM <u>A</u> SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDG VEVHNAKTKPREEQYNSTYRVSVLTVLHQDWLNGKEYK CKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVTLPSSRDELTK NQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVVLK SDGSFFLYSDLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYT QKSLSLSPG
SEQ ID NO: 66	DKTHTCPPCPAPELLGGPSVLFPPKPKDTLMISRTPEVT CVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNS TYRVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISK AKGQPREPQVTLPPICRDKLTKNQVSLWCLVKGFYPSDI AVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSR WQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKGHHHHGG GGGGGGGGGGGGGGDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLF PPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGV EVHNAKTKP <u>P</u> EEQYNSTYRVSVLTVLHQDWLNGKEYKC KVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVTLPSSRDELTKN QVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVVLKS DGSFFLYSDLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQ KSLSLSPG

	Sequência de Aminoácidos
SEQ ID NO: 67	DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVT CVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNS TYRVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTI AKGQPREPQVTLPPICRDQLTKNQVSLWCLVKGFYPSDI AVEWESNGQPENNYKTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSR WQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKGHHGGGG GGGGGGGGGGGGGGDKTHCTCPPCPAPELLGGPSVFLF PPKPKDTLM <u>A</u> SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDG VEVHNAKTKP <u>P</u> EEQYNSTYRVSVLTVLHQDWLNGKEYK CKVSNKALPAPIEKTI <u>K</u> AKGQPREPQVTLPPICRDQLTK NQVSLTCLVKGFYPSDI <u>AV</u> EWESNGQPENNYKTPVLDKSR SDGSFFLYSDLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYT QKSLSLSPG
SEQ ID NO: 68	DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLM <u>A</u> SRTPEVT CVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNS TYRVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTI AKGQPREPQVTLPPICRDQLTKNQVSLWCLVKGFYPSDI AVEWESNGQPENNYKTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSR WQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKGHHGGGG GGGGGGGGGGGGDKTHCTCPPCPAPELLGGPSVFLF PPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDG EVHNAKTKP <u>P</u> EEQYNSTYRVSVLTVLHQDWLNGKEYK C <u>C</u> VSNKALPAPIEKTI <u>K</u> AKGQPREPQVTLPPICRDQLTK NQVSLTCLVKGFYPSDI <u>AV</u> EWESNGQPENNYKTPVLDKSR DGSFFLYSDLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQ KSLSLSPG

	Sequência de Aminoácidos
SEQ ID NO: 69	DKTHTCPPCPAPELLGGPSVLFPPKPKDTLM <u>A</u> SRTPEVT CVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKT <u>K</u> PREEQYNS TYRVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISK AKGQPREPQVYTLPPCRDKLTKNQVSLWCLVKGFYPSDI AVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSR WQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKGGGGGGG GGGGGGGGGGGGGGDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLF PPKPKDTLM <u>A</u> SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDG VEVHNAKT <u>K</u> P <u>P</u> EEQYNSTYRVSVLTVLHQDWLNGKEYK CKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTK NQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVVLK SDGSFFLYSDLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYT QKSLSLSPG
SEQ ID NO: 70	DKTHTCPPCPAPELLGGPSVLFPPKPKDTLMISRTPEVT CVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKT <u>K</u> P <u>P</u> EEQYNS TYRVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISK AKGQPREPQVCTLPPSRDELTKNQVSLSCAVDGFYPSDI AVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSR WQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
SEQ ID NO: 71	DKTHTCPPCPAPELLGGPSVLFPPKPKDTLMISRTPEVT CVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKT <u>K</u> P <u>P</u> EEQYNS TYRVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISK AKGQPREPQVCTLPPSRDELTKNQVSLSCAVDGFYPSDI AVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSR WQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG

	Sequência de Aminoácidos
SEQ ID NO: 72	DKTHTCPPCPAPELLGGPSVLFPPKPKDTLMISRTPEVT CVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKT <u>KP</u> <u>P</u> EEQYNS TYRVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISK AKGQPREPQVTLPPICRDKLTKNQVSLWCLVKGFYPSDI AVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSR WQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKGGGGGGG GGGGGGGGGGGGGGDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLF PPKPKDTLM <u>A</u> SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDG VEVHNAKT <u>K</u> PREEQYNSTYRVSVLTVLHQDWLNGKEYK CKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVTLPPICRDKLTK NQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVVLK SDGSFFLYSDLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYT QKSLSLSPG
SEQ ID NO: 73	DKTHTCPPCPAPELLGGPSVLFPPKPKDTLM <u>A</u> SRTPEVT CVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKT <u>KP</u> <u>P</u> EEQYNS TYRVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISK AKGQPREPQVCTLPPICRDKLTKNQVSLSCAVDGFYPSDI AVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSR WQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
SEQ ID NO: 74	DKTHTCPPCPAPELLGGPSVLFPPKPKDTLM <u>A</u> SRTPEVT CVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKT <u>KP</u> <u>P</u> EEQYNS TYRVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISK AKGQPREPQVTLPPICRDKLTKNQVSLWCLVKGFYPSDI AVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSR WQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKGGGGGGG GGGGGGGGGGGGDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLF PPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGV EVHNAKT <u>K</u> PREEQYNSTYRVSVLTVLHQDWLNGKEYK C <u>V</u> SNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVTLPPICRDKLTK NQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVVLK SDGSFFLYSDLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQ KSLSLSPG

	Sequência de Aminoácidos
SEQ ID NO: 75	DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLM <u>A</u> SRTPEVT CVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKT <u>KP</u> P <u>E</u> EQYNS TYRVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTI AKGQPREPQVYTLPPCRDKLTKNQVSLWCLVKGFYPSDI AVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSR WQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKG GGGGGG GGGGGGGGGGGGDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLF PPKPKDTLM <u>A</u> SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDG VEVHNAKT <u>KP</u> REE <u>Q</u> YNSTYRVSVLTVLHQDWLNGKEYK CKVSNKALPAPIEKTI <u>S</u> AKGQPREPQVYTLPPSRDELTK NQVSLTCLVKGFYPSDI A VEWESNGQPENNYKTPPVVLK SDGSFFLYSDLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYT QKSLSLSPG
SEQ ID NO: 76	DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVT CVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKT <u>KP</u> P <u>E</u> EQYNS TYRVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTI AKGQPREPQVYTLPPCRDKLTKNQVSLWCLVKGFYPSDI AVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSR WQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKG GGGGGG GGGGGGGGGGGGDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLF PPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGV EVHNAKT <u>KP</u> P <u>E</u> QYNSTYRVSVLTVLHQDWLNGKEY <u>KC</u> KVSNKALPAPIEKTI <u>S</u> AKGQPREPQVYTLPPSRDELTKN QVSLTCLVKGFYPSDI A VEWESNGQPENNYKTPPVVLK DGSFFLYSDLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYT <u>Q</u> KSLSLSPG

	Sequência de Aminoácidos
SEQ ID NO: 77	DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVT CVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKT <u>KP</u> <u>P</u> EEQYNS TYRVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTI AKGQPREPQVYTLPPCRDKLTKNQVSLWCLVKGFYPSDI AVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSR WQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKG GGGGGG GGGGGGGGGGGGDKTH <u>T</u> C <u>P</u> PAPELLGGPSVFLF PPKPKDTLM <u>A</u> SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDG VEVHNAKT <u>KP</u> <u>P</u> EEQYNSTYRVSVLTVLHQDWLNGKEYK CKVSNKALPAPIEKTI <u>S</u> KAKGQPREPQVYTLPPSRDELTK NQVSLTCLVKGFYPSDI <u>A</u> VEWESNGQPENNYKTPPVVLK SDGSFFLYSDLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYT QKSLSLSPG
SEQ ID NO: 78	DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLM <u>A</u> SRTPEVT CVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKT <u>KP</u> <u>P</u> EEQYNS TYRVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTI AKGQPREPQVYTLPPCRDKLTKNQVSLWCLVKGFYPSDI AVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSR WQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKG GGGGGG GGGGGGGGGGGGDKTH <u>T</u> C <u>P</u> PAPELLGGPSVFLF PPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDG EVHNAKT <u>KP</u> <u>P</u> EEQYNSTYRVSVLTVLHQDWLNGKEY <u>KC</u> KVS <u>N</u> KALPAPIEKTI <u>S</u> KAKGQPREPQVYTLPPSRDELTK QVSLTCLVKGFYPSDI <u>A</u> VEWESNGQPENNYKTPPVVLK DGSFFLYSDLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYT <u>Q</u> K <u>S</u> LSLSPG

	Sequência de Aminoácidos
SEQ ID NO: 79	DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLM <u>A</u> SRTPEVT CVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKT <u>KP</u> <u>P</u> EEQYNS TYRVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTI AKGQPREPQVYTLPPCRDKLTKNQVSLWCLVKGFYPSDI AVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSR WQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKGGGGGG GGGGGGGGGGGGDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLF PPKPKDTLM <u>A</u> SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDG VEVHNAKT <u>KP</u> <u>P</u> EEQYNSTYRVSVLTVLHQDWLNGKEYK CKVSNKALPAPIEKTI SKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTK NQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLK SDGSFFLYSDLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYT QKSLSLSPG
As mutações (modificações) I253A e R292P são indicadas em negrito e <u>sublinhado</u> (quando presentes)	

Exemplo 10. Avaliação de modificações de aminoácido I253A e R292P na especificidade de ligação do receptor Fc

[00328] Um ensaio de ligação à base de células foi utilizado para confirmar que as modificações de aminoácido nas posições I253, por exemplo, I253A e R292, por exemplo, R292P, eram específicas para os receptores pretendidos, por exemplo, afinidade de ligação reduzida ao receptor FcRn e receptor Fc γ RIIb, respectivamente. Ligação relativa de construtos de Fc e controles a receptores Fc gama (Fc γ Rs) foi medida usando kits de ensaios de competição (CISBIO®) de transferência de energia de ressonância por fluorescência por tempo (TR-FRET) homogêneos à base de células para Fc γ RI, Fc γ RIIa H131, Fc γ RIIb e Fc γ RIIia V158. Os reagentes de ensaio foram preparados de acordo com as instruções do fabricante. Uma série de diluição seriada de 10 pontos, de 3 vezes, mais uma matriz em branco por amostra, foi gerada usando um manipulador de líquido automatizado (Freedom EVOware 150, TECAN®). As placas de ensaio foram lidas em

um leitor fluorescente PHERAstar (BMG Labtech GmbH) a 665 e 620 nm. Uma amostra de IgG1 foi usada como um controle. A Fig. 19 A-D mostra que as mutações R292P no construto 16 e construto 18 reduziram drasticamente a ligação a células que expressam Fc γ RIIb em comparação com o controle de IgG1, enquanto têm impacto mínimo na ligação a Fc γ RI, Fc γ RIIa e Fc γ RIIIa. No entanto, as mutações I253A tiveram um impacto mínimo na ligação a qualquer receptor Fc gama, conforme demonstrado pela semelhança dos perfis de ligação do construto 6 e do construto 4, e a semelhança dos perfis de ligação do construto 18 e do construto 16.

[00329] Para avaliar o impacto das modificações de aminoácido na posição I253, por exemplo, I253A e R292, por exemplo, R292P, na ligação de FcRn, um experimento de ligação de ressonância plasmônica de superfície (SPR) foi projetado para medir a afinidade e o nível de ligação normalizado de FcRn humano de fase de solução a construtos de Fc imobilizados ao sensor em pH 6,0. Uma IgG anti-humana de cabra foi imobilizada em superfícies de sensor de referência e de teste usando química de acoplamento de amina. Os construtos de Fc foram capturados na superfície do sensor de teste. FcRn humano recombinante foi derramado sobre a superfície do sensor em uma série de diluições com uma concentração superior de 1,0 μ m. A superfície do sensor foi regenerada no final de cada ciclo com 10 mM de glicina a pH 1,7. Sensorgramas subtraídos de referência dupla foram submetidos a análise de ligação de equilíbrio; o nível de ligação máximo (RMax) e a constante de dissociação de equilíbrio (K_D) foram estimados. O nível de ligação máximo normalizado foi calculado dividindo-se RMax pelo nível de captura do construto de FC. O construto 16 foi capturado no mesmo nível que o construto 4, indicando que não há perda de ligação a FcRn como esperado (FIG. 20). O construto 6 e o construto 18 mostraram níveis de captura significativamente reduzidos,

consistentes com os dois domínios Fc perderem afinidade para FcRn conforme pretendido (FIG. 20). Da mesma forma, o construto 7 e o construto 19, que tiveram mutações em todos os três domínios para limitar a ligação a FcRn, não ligaram FcRn (FIG. 20).

[00330] Juntos, esses dados demonstram que a mutação para reduzir a ligação a Fc γ RIIb (por exemplo, uma modificação de aminoácido na posição R292, por exemplo, R292P) teve o efeito pretendido com pouco impacto na ligação a outros receptores Fc gama e impacto mínimo na ligação de FcRn. Da mesma forma, a mutação para reduzir a ligação a FcRn (por exemplo, uma modificação de aminoácido na posição I253, por exemplo, I253A) teve o efeito desejado com impacto mínimo na ligação do receptor Fc gama. Além disso, as duas mutações (por exemplo, mutações I253 e R292, tais como I253A e R292P) poderiam ser combinadas para se alcançar ligação de construto de Fc diminuída a ambos Fc γ RIIb e FcRn.

Exemplo 11. Avaliação de modificações de aminoácidos I253A e R292P na farmacocinética do receptor Fc em camundongos

[00331] O impacto das mutações relacionadas à ligação na farmacocinética foi inicialmente avaliado comparando-se os construto 4, construto 16, que reduziram a ligação de Fc γ RIIb em todos os três domínios Fc e o construto 6, que reduziu a ligação de FcRn em dois domínios Fc. IVIg foi incluído como um comparador mostrando comportamento típico de IgG. Camundongos fêmea C57BL/6 ($n=12$, 8-10 semanas de idade) receberam doses por via intravenosa (i.v.) com 0,1 g/kg cada do construto 4, construto 6, construto 16, ou IVIg. Amostras de sangue (50 μ L) foram coletadas de veias safenas de quatro camundongos por ponto de tempo em momentos alternados de 15 min, 30 min, 1 hora, 2 horas, 4 horas, 6 horas, 8 horas, 1 dia, 2 dias, 3 dias, 4 dias e 5 dias. Todos os camundongos foram sangrados aos 7, 9, 11, 14, 16, 21 e 23 dias. O construto de Fc e as concentrações séricas de

IVIg foram determinados por ELISA específico para Fc de IgG1 humana. Como demonstrado na Fig. 21, tanto o construto de Fc 6 quanto o construto 16 tinham persistência mais duradoura in vivo e resultaram em potencializações de 1,2 a 1,5 vezes no tempo de permanência médio (MRT) (anteriormente, potencializações (por exemplo, três a quatro vezes) foram medidas por área sob a curva (AUC)).

[00332] Para explorar adicionalmente o impacto da valência de modificação de aminoácido I253A em relação a FcRn na farmacocinética, três compostos com um, dois ou três domínios com afinidade reduzida a FcRn foram comparados conforme descrito acima. Como pode ser visto na FIG. 22, todos os mutantes persistiram por mais tempo do que o composto de origem. O tempo de residência médio (MRT) sistematicamente aumentou com cada domínio Fc modificado para diminuir a afinidade a FcRn. A exposição à droga também pode ser medida por AUC.

[00333] O efeito da combinação das mutações também foi explorado (FIG. 23). A incorporação de mutações a ambos os receptores potencializou a MRT em três vezes, em comparação com a potencialização de duas vezes alcançada neste estudo, reduzindo a ligação a FcγRIIb. A exposição à droga também pode ser medida por AUC, por exemplo, uma potencialização de seis vezes.

Exemplo 12. Avaliação de modificações de aminoácidos I253A e R292P na eficácia in vitro

[00334] O impacto das mutações de ligação na eficácia in vitro foi avaliado usando ensaios que anteriormente demonstraram ser sensíveis à valência em direção aos receptores Fc gama. A inibição da fagocitose em células THP-1 foi comparável entre todos os construtos de Fc (FIG. 24). Células THP-1 foram plaqueadas em placas de 96 poços. Os construtos de Fc foram diluídos em 10 vezes e adicionados às células. A incubação procedeu por 15 min a 37°C; grânulos de

látex revestidos com IgG de coelho marcada com FITC (Cayman Chemical) foram então adicionados às células. A incubação prosseguiu por 3 h a 37° C. As células foram lavadas duas vezes e ressuspensas em 100 µl de tampão FACS (PBS/2% FBS); azul de triptano foi adicionado para extinguir o sinal FITC da superfície celular e as amostras foram lidas em um citômetro de fluxo BD Canto. Os dados são relatados como a porcentagem de células FITC positivas em comparação com a população de células total na ausência de inibidor (100% de fagocitose).

[00335] A liberação de IL-8 por monócitos estimulados por IgG immobilizados em placa foi inibida comparativamente por todos os construtos de Fc (FIG. 25). PBMCs foram isolados de camadas leucoplaquetárias de doadores humanos saudáveis (Research Blood Components) por centrifugação por gradiente de densidade na Ficoll-Paque Plus (GE Healthcare Life Sciences). Os monócitos foram isolados por seleção negativa usando o Human Monocyte Enrichment Kit without CD16 Depletion (StemCell Technologies). A produção de citocinas mediada por R do Fc foi estimulada usando placas de 96 poços revestidas ao longo da noite com 50 µl de 100 µg/ml de IgG1 humana (SouthernBiotech). IVIg ou cada construto de Fc foi diluído em série na placa de cultura em duas vezes a concentração final no ensaio. Monócitos purificados ($1,5 \times 10^5$ células/poço) foram adicionados, incubados por 24 h, e os sobrenadantes de cultura analisados para concentração de IL-8 (Kit Custom Human Cytokine para alta abundância de IL-8, Meso Scale Discovery).

[00336] Da mesma forma, a inibição da ADCC foi comparável em todos os construtos de Fc (FIG. 26). Células NK (Hemacare) foram descongeladas e deixadas repousar durante a noite em meio LGM-3 (Lonza). Células Raji cultivadas foram incubadas na presença de diferentes concentrações de cada composto teste e rituximabe (2ug/ml)

por 30 minutos antes das células NK serem adicionadas em uma razão efetor:célula alvo de 50K:10K. Células NK e Raji também foram plaqueadas na presença das sondas apenas. As células foram incubadas por 6 horas. Cittox-Glo foi usado para leitura.

[00337] Em todos os ensaios, as mutações causaram reduções insignificantes na eficácia.

Exemplo 13. Avaliação de modificações de aminoácidos I253A e R292P na eficácia *in vivo*

[00338] Para avaliar adicionalmente o impacto das mutações de ligação ao receptor na atividade, os construtos de Fc foram testados *in vivo* usando o modelo de artrite induzida por anticorpo contra colágeno (CAIA). Camundongos C57BL/6 machos foram injetados i.p. com um coquetel de anticorpo monoclonal artritogênico de quatro anticorpos para colágeno II (ArthritoMab, MDBiosciences; 8 mg). No Dia 4, os animais foram injetados por via i.p. com lipopolissacárido (100 µg). Para a dosagem terapêutica, os animais foram aleatorizados com base na gravidade da doença nos grupos do estudo no Dia 6, excluindo animais com fraca indução da doença (pontuação 0 no dia da aleatorização) e dosados i.v. com veículo ou composto teste. Para dosagem profilática, os animais receberam doses i.v. com veículo ou composto teste em um único dia variando do Dia 1 ao Dia -14 (os dias foram numerados omitindo o zero). Os parâmetros de escore clínico foram como segue: 0 = normal, nenhum inchaço, vermelhidão ou distorção; flexibilidade total nas articulações. 1 = artrite leve: inchaço e/ou distorção leve; flexibilidade total nas articulações. 2 = artrite moderada: inchaço e/ou distorção moderado; flexibilidade nas articulações ou força de preensão reduzidas. 3 = artrite grave: inchaço e/ou distorção graves; flexibilidade nas articulações ou força de preensão severamente reduzidas. 4 = articulações anquilosadas; sem flexibilidade nas articulações e movimentação severamente reduzida, moribundo. Os ani-

mais foram sacrificados após 12 dias.

[00339] Como mostrado na FIG. 27, a redução da ligação a Fc γ RIIb (construto 16), FcRn (construto 6), ou ambos (construto 18) teve efeito mínimo sobre a eficácia em relação à molécula de origem (construto 4).

Exemplo 14. Avaliação de modificações de aminoácidos I253A e R292P na durabilidade da resposta *in vivo*

[00340] Camundongos do modelo CAIA foram tratados profilaticamente até 14 dias antes da injeção com anticorpos artrogênicos. Como visto na Figura 28, o tratamento profilático no Dia 1 foi mais eficaz com o Q1 de depuração mais lenta (Construto 18) do que com o construto 4, presumivelmente devido a maior exposição à droga durante a indução da doença de múltiplos dias. O composto 4 perdeu a eficácia quando administrado 3 dias antes da indução da doença (FIG. 29), enquanto Q1 (Construto 18) forneceu proteção, mesmo quando dosado até 7 dias antes da indução da doença (FIG. 30). Ambos os construtos foram ineficazes quando administrados 10 dias antes da indução da doença (FIG. 31). Estes resultados demonstram que o perfil farmacocinético mais longo do construto 18 em comparação com o construto 4 é traduzido em uma maior durabilidade de resposta.

[00341] A dosagem profilática no modelo CAIA foi realizada com 100 mg/kg de construto 4 (molécula de origem), construto 18 (I253A em dois domínios e R292P em três domínios)(Q1), ou construto 19 (I253A e R292P em todos os três domínios)(Q2) no Dia 1 (FIG. 32), Dia -3 (FIG. 33), Dia -7 (FIG. 34), ou Dia -10 (FIG. 35). O controle do veículo (solução salina) foi dosado apenas no Dia 1.

[00342] A FIG. 32 é um gráfico que compara a eficácia do construto 4 (AA: quadrados pretos, linha sólida), construto 18, (Q1: triângulos pretos, linha tracejada), construto 19 (Q2: diamantes pretos, linha pontilhada), ou salina (círculos cinzas, linha tracejada-pontilhada) dosados

profilaticamente a 100 mg/kg no dia 1 em um modelo de artrite induzido por anticorpo contra colágeno (CAIA). A FIG. 33 é um gráfico comparando o construto 4 (AA: quadrados pretos, linha sólida), construto 18 (Q1: triângulos pretos, linha tracejada) ou construto 19 (Q2: diamantes pretos, linha pontilhada) dosados a 100 mg/kg no dia -3. A FIG. 34 é um gráfico comparando o construto 4 (AA: quadrados pretos, linha sólida), construto 18 (Q1: triângulos pretos, linha tracejada) ou construto 19 (Q2: diamantes pretos, linha pontilhada) dosados a 100 mg/kg no dia -7. A FIG. 35 é um gráfico comparando o construto 4 (AA: quadrados pretos, linha sólida), construto 18 (Q1: triângulos pretos, linha tracejada) ou construto 19 (Q2: diamantes pretos, linha pontilhada) dosados a 100 mg/kg no dia -10. Para cada, um volume equivalente de solução salina (círculos cinzas, linha tracejada-pontilhada) foi dosado no dia 1. A média e o erro padrão da média são mostrados para cada ponto no tempo.

Exemplo 15. Avaliação de Modificações de Aminoácidos I253A e R292P em Multímeros Fc

[00343] Multímeos Fc foram gerados conforme descrito em (Strome et al, US 2010/0239633 A1; Jain et al, Arthritis Res. Ther. 14, R192 (2012)). Especificamente, IgG1 Fc foi fundida no terminal C a uma sequência de dobradiça IgG2. Construtos de DNA foram gerados usando sequência Fc de IgG1 de tipo selvagem (construto X1) e usando o mutante duplo I253A/R292P (construto X2). Construtos de plamídeo de DNA foram transfetados via lipossomas em células HEK293. Após sete dias em cultura, as células foram depuradas por centrifugação.

[00344] As proteínas expressadas foram purificadas a partir do sobrenadante da cultura de células por cromatografia em coluna de afinidade com base em Proteína A, usando uma coluna Poros MabCapture A. Os construtos capturados foram lacados com solução salina tampo-

nada de fosfato (lavagem com baixo teor de sal) e eluída com 100 mM de glicina, pH 3. O eluato foi rapidamente neutralizado pela adição de 1 M TRIS pH 7,4 e submetido a filtração estéril através de um filtro de 0,2 µm.

[00345] As proteínas foram adicionalmente fracionadas por cromatografia de troca iônica usando resina Poros XS. A coluna foi pré-equilibrada com MES de 50 mM, pH 6 (tampão A), as amostras foram diluídas no tampão de equilíbrio antes do carregamento. A coluna foi eluída usando um gradiente multi-etapas com MES de 50 mM, cloreto de sódio de 400 mM, pH 6 (tampão B) como tampão de eluição. As etapas do gradiente incluem 0-40% B para 2 volumes de coluna (CV) para remover as espécies com baixa massa molecular, uma etapa se mantém a 40% B (4 CV), seguida por 40-80% (4 CV) para isolar as espécies alvo e, então, aumentar linearmente até 100% B. Todas as frações contendo proteína foram selecionadas por cromatografia por exclusão de tamanho analítico e os componentes quantificados por absorbância a 280 nm. Frações com não mais do que 8% do teor total de Fc (aproximadamente 50 kDa) mais dímero Fc (aproximadamente 100 kDa) foram excluídas. Para o Construto X1, todas as frações restantes foram combinadas. Devido a uma mudança na distribuição de peso molecular entre Construtos X1 e X2, frações do Construto X2 foram selecionadas para imitar a distribuição de peso molecular do Construto X1.

[00346] Após a troca iônica, a fração alvo foi trocada por meio de tampão em tampão PBS usando um cartucho de membrana polietersulfona (PES) com cutoff de 30 kDa em um sistema de filtração de fluxo tangencial. As amostras foram concentradas a aproximadamente 30 mg/mL e submetidas à filtração estéril através de um filtro de 0,2 µm.

[00347] As distribuições de peso molecular dos Construto 4 e Cons-

truto X1 foram comparadas por cromatografia de exclusão de tamanho analítica (Fig. 36)(construtos purificados X1 (cinza) e X2 (preto), normalizadas para os picos máximos) e eletroforese de gel de dodecil sulfato-poliacrilamida de sódio (FIG. 37)(construto purificado X1 (direita), construto X2 purificado (meio), e padrões de peso molecular (direita). Massas iguais dos dois construtos foram carregadas). Os construtos X1 e X2 compreendem várias espécies que variam de ~100 kDa (dois domínios Fc) com diversas bandas acima de 250kDa e sem um componente único na maioria delas. A distribuição de tamanho do Construto X2 é similar à do Construto X1, mas ligeiramente mais ampla com mais de ambos os componentes de peso molecular mais alto e mais baixo.

[00348] O camundongo fêmea C57BL/6 ($n=15$, 8 semanas de idade) receberam doses por via intravenosa (i.v.) com 0,1 g/kg cada do construto X1 ou construto 4. O sangue (25 μ L) foi colhido da veia submandibular e processado para verificar soro. Quatro camundongos por grupo foram sangrados em pontos no tempo alternantes durante 5 dias, enquanto, em todos os pontos no tempo remanescentes, todos os quinze camundongos foram sangrados em cada grupo. Os pontos no tempo de coleta incluem 15 e 30 min; 1, 2, 4, 6, 8, 24 h; 2 dias. As concentrações séricas de multímero Fc foram determinadas por um ELISA de IgG anti-humana com um anticorpo de detecção específico a Fc.

[00349] Conforme demonstrado na FIG. 38, os níveis séricos do construto X1 são mais baixos do que aqueles do construto X2 em cada um dos pontos no tempo. A introdução das mutações I253A e R292P no construto X2 atrasou a depuração do multímero Fc em comparação com o material de tipo selvagem correspondente (construto X1).

Exemplo 16. Avaliação de modificações de aminoácidos I253A e R292P na farmacocinética do receptor Fc em macacos cinomol-

gos

[00350] O impacto das mutações relacionadas à ligação na farmacocinética em macacos cinomolgos foi avaliado comparando-se os construtos 6, 16 e 18. Dados históricos para o construto 4 vieram de um estudo em macacos cinomolgos realizado a diferentes níveis de dose em comparação ao estudo comparando os construtos 6, 16 e 18. Macacos cinomolgos machos (N=3) foram dosados i.v. com 10 ou 30 mg/kg de cada um dos construtos 6, 16 e 18. Amostras de sangue foram coletadas ao longo de 44 dias. As concentrações de construto de Fc foram determinadas por ELISA usando anticorpos específicos para construtos de Fc de IgG1 humana, incluindo construtos 4, 6, 16 e 18.

[00351] Conforme demonstrado na Figura 39, o construto 16 dosado a 10 mg/kg persiste por mais tempo in vivo do que o construto 4 dosado a 20 mg/kg. O construto 18 dosado a 10 mg/kg tem persistência semelhante in vivo à do construto 4 dosado a 20 mg/kg. O construto 6 dosado a 10 mg/kg não persiste por tanto tempo in vivo quanto o construto 4 dosado a 20 mg/kg.

[00352] Conforme demonstrado na Figura 40, o construto 16 dosado a 30 mg/kg persiste por mais tempo in vivo do que o construto 4 dosado a 20 ou 50 mg/kg. A persistência do construto 18 dosado a 30 mg/kg é intermediária entre as do construto 4 dosado a 20 ou 50 mg/kg. O construto 6 dosado a 30 mg/kg não persiste por tanto tempo in vivo quanto o construto 4 dosado a 20 ou 50 mg/kg.

[00353] Vale notar que o comportamento farmacocinético em macacos cinomolgos difere daquele em camundongos. Em camundongos, tanto a redução da ligação de FcRn quanto de Fc gama RIIb resultou em aumento da persistência, e a combinação de ambos resultou em aumentos adicionais na persistência. Em macacos cinomolgos, a redução de FCrn reduziu a persistência, a redução da ligação

de Fc gama RIIb aumentou a persistência, e a combinação apresentou pouca mudança líquida na persistência em comparação com a molécula de origem (construto 4).

Outras Modalidades

[00354] Todas as publicações, patentes e pedidos de patente mencionados nesse relatório descritivo estão incorporados ao presente documento por referência na mesma medida, como se cada publicação ou pedido de patente independente fossem especificamente e individualmente indicados como sendo incorporados por referência.

[00355] Embora a descrição tenha sido descrita em relação às suas modalidades específicas, entende-se que ela seja capaz de modificações adicionais e que o presente pedido pretenda abranger quaisquer variações, usos ou adaptações da descrição, seguindo, de modo geral, os princípios da descrição e incluindo desvios da descrição decorrentes de práticas conhecidas e comuns na técnica à qual a descrição pertence e possam ser aplicados às características essenciais previamente estabelecidas no presente documento, e segue o escopo das reivindicações.

[00356] Outras modalidades estão incluídas nas reivindicações.

REIVINDICAÇÕES

1. Construto de Fc **caracterizado** pelo fato de que compreende:

- a) um primeiro polipeptídeo compreendendo
 - i). um primeiro monômero de domínio Fc;
 - ii). um segundo monômero de domínio Fc; e
 - iii). um peptídeo de ligação que une o primeiro monômero de domínio Fc ao segundo monômero de domínio Fc;
- b). um segundo polipeptídeo compreendendo
 - i). um terceiro monômero de domínio Fc;
 - ii). um quarto monômero de domínio Fc; e
 - iii). um peptídeo de ligação que une o terceiro monômero de domínio Fc ao quarto monômero de domínio Fc;
- c) um terceiro polipeptídeo que compreende um quinto monômero de domínio Fc; e
- d) um quarto polipeptídeo compreende um sexto monômero de domínio Fc;

em que o primeiro monômero de domínio Fc e o quinto monômero de domínio Fc se combinam para formar um primeiro domínio Fc; o segundo monômero de domínio Fc e o quarto monômero de domínio Fc se combinam para formar um segundo domínio Fc; e o terceiro monômero de domínio Fc e o sexto monômero de domínio Fc se combinam para formar um terceiro domínio Fc; cada um dentre os primeiro e segundo polipeptídeos compreendendo a sequência

DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVS
HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPPEEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIISKAKGQPREPVYTLPPCRDKLT
KNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKG
GGGGGGGGGGGGGGGGDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPK

KDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPPE
 EQYNSTYRVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIKAK
 GQPREPVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQ
 PENNYKTPPVLSKSDGSFFLYSDLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEAL
 HNHYTQKSLSLSPG (SEQ ID NO: 76);

e cada um dentre o terceiro e quarto polipeptídeos compreendendo a sequência

DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVS
 HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPPEEQYNSTYRVSVLTVLHQD
 WLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIKAKGQPREPQVCTLPPSRDELT
 KNQVSLSCAVDGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFF
 LVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG (SEQ
 ID NO: 70).

2. Construto de Fc **caracterizado** pelo fato de que comprehende:

- a) um primeiro polipeptídeo compreendendo
 - i). um primeiro monômero de domínio Fc;
 - ii). um segundo monômero de domínio Fc; e
 - iii). um peptídeo de ligação que une o primeiro monômero de domínio Fc ao segundo monômero de domínio Fc;
- b). um segundo polipeptídeo compreendendo
 - i). um terceiro monômero de domínio Fc;
 - ii). um quarto monômero de domínio Fc; e
 - iii). um peptídeo de ligação que une o terceiro monômero de domínio Fc ao quarto monômero de domínio Fc;
- c) um terceiro polipeptídeo que compreende um quinto monômero de domínio Fc; e
- d) um quarto polipeptídeo compreende um sexto monômero de domínio Fc;

em que o primeiro monômero de domínio Fc e o quinto monômero de domínio Fc se combinam para formar um primeiro domínio

Fc, o segundo monômero de domínio Fc e o quarto monômero de domínio Fc se combinam para formar um segundo domínio Fc, e o terceiro monômero de domínio Fc e o sexto monômero de domínio Fc se combinam para formar um terceiro domínio Fc, e em que pelo menos um monômero de domínio Fc compreende uma substituição de aminoácido na posição I253.

3. Construto de Fc, de acordo com a reivindicação 2, **caracterizado** pelo fato de que cada substituição de aminoácido na posição I253 é I253A.

4. Construto de Fc, de acordo com a reivindicação 2, **caracterizado** pelo fato de que pelo menos um monômero de domínio Fc compreende uma substituição de aminoácido na posição R292.

5. Construto de Fc **caracterizado** pelo fato de que compreende:

a) um primeiro polipeptídeo compreendendo

- i). um primeiro monômero de domínio Fc;
- ii). um segundo monômero de domínio Fc; e

iii). um peptídeo de ligação que une o primeiro monômero de domínio Fc ao segundo monômero de domínio Fc;

b). um segundo polipeptídeo compreendendo

- i). um terceiro monômero de domínio Fc;
- ii). um quarto monômero de domínio Fc; e

iii). um peptídeo de ligação que une o terceiro monômero de domínio Fc ao quarto monômero de domínio Fc;

c) um terceiro polipeptídeo que compreende um quinto monômero de domínio Fc; e

d) um quarto polipeptídeo compreende um sexto monômero de domínio Fc;

em que o primeiro monômero de domínio Fc e o quinto monômero de domínio Fc se combinam para formar um primeiro domínio

Fc, o segundo monômero de domínio Fc e o quarto monômero de domínio Fc se combinam para formar um segundo domínio Fc, e o terceiro monômero de domínio Fc e o sexto monômero de domínio Fc se combinam para formar um terceiro domínio Fc, e em que pelo menos um monômero de domínio Fc compreende uma substituição de aminoácido na posição R292.

6. Construto de Fc, de acordo com a reivindicação 2, **caracterizado** pelo fato de que cada um dentre o primeiro polipeptídeo e o segundo polipeptídeo compreende a sequência

DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMASRTPEVTCVVVDVS
 HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPPEEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPVYTLPPCRDKLT
 KNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKG
 GGGGGGGGGGGGGGGDKHTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPPE
 EQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQ
 PENNYKTTPPVLKSDGSFFLYSDLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG (SEQ ID NO: 78).

7. Construto de Fc, de acordo com a reivindicação 2, **caracterizado** pelo fato de que cada um dentre o primeiro polipeptídeo e o segundo polipeptídeo compreende a sequência

DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVS
 HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPVYTLPPCRDKLT
 KNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKG
 GGGGGGGGGGGGGGGDKHTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKP
 RE

EQYNSTYRVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIKAK
GQPREPQVTLPSSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQ
PENNYKTPPVLSKSDGSFFLYSDLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEAL
HNHYTQKSLSLSPG (SEQ ID NO: 49).

8. Construto de Fc, de acordo com a reivindicação 2, **caracterizado** pelo fato de que cada um dentre o primeiro polipeptídeo e o segundo polipeptídeo compreende a sequência

DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVS
HEDPEVFKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVSVLTVLHQD
WLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIKAKGQPREPQVTLPCCRDKLT
KNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFF
LYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKG
GGGGGGGGGGGGGGGGDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPK
KDTLMASRTPEVTCVVVDVSHEDPEVFKFNWYVDGVEVHNAKTKP
RE EQYNSTYRVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIKAK
GQPREPQVTLPSSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQ
PENNYKTPPVLSKSDGSFFLYSDLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEAL
HNHYTQKSLSLSPG (SEQ ID NO: 62).

9. Construto de Fc, de acordo com a reivindicação 2, **caracterizado** pelo fato de que cada um dentre o primeiro polipeptídeo e o segundo polipeptídeo compreende a sequência

DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMASRTPEVTCVVVDVS
HEDPEVFKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVSVLTVLHQD
WLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIKAKGQPREPQVTLPCCRDKLT
KNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFF
LYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKG
GGGGGGGGGGGGGGDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPK
KDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVFKFNWYVDGVEVHNAKTKP
RE EQYNSTYRVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIKAK
GQPREPQVTLPSSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQ

PENNYKTPPVLKSDGSFFLYSDLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEAL
HNHYTQKSLSLSPG (SEQ ID NO: 64).

10. Construto de Fc, de acordo com a reivindicação 2, **caracterizado** pelo fato de que cada um dentre o primeiro polipeptídeo e o segundo polipeptídeo compreende a sequência

DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMASRTPEVTCVVVDVS
HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQD
WLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIISKAKGQPREPQVYTLPPCRDKLT
KNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQ PENNYKTPPVLDSDGSFF
LYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKG
GGGGGGGGGGGGGGGGDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKP
KDTLMASRTPEVTCVVVDVS HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTPRE
EQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIISKAK
GQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQ
PENNYKTPPVVLKSDGSFFLYSDLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEAL
HNHYTQKSLSLSPG (SEQ ID NO: 65).

11. Construto de Fc, de acordo com a reivindicação 2, **caracterizado** pelo fato de que cada um dentre o primeiro polipeptídeo e o segundo polipeptídeo compreende a sequência

DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVS
HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQD
WLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIISKAKGQPREPQVYTLPPCRDKLT
KNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQ PENNYKTPPVLDSDGSFF
LYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKG
GGGGGGGGGGGGGGDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKP
KDTLMISRTPEVTCVVVDVS HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTPPE
EQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIISKAK
GQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQ
PENNYKTPPVVLKSDGSFFLYSDLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEAL
HNHYTQKSLSLSPG (SEQ ID NO: 66).

12. Construto de Fc, de acordo com a reivindicação 2, **caracterizado** pelo fato de que cada um dentre o primeiro polipeptídeo e o segundo polipeptídeo compreende a sequência

DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVS
HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCRDKLT
KNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFF
LYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKG
GGGGGGGGGGGGGGGGDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKP
KDTLMASRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPPE
EQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK
GQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQ
PENNYKTPPVLDSDGSFFLYSDLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEAL
HNHYTQKSLSLSPG (SEQ ID NO: 67).

13. Construto de Fc, de acordo com a reivindicação 2, **caracterizado** pelo fato de que cada um dentre o primeiro polipeptídeo e o segundo polipeptídeo compreende a sequência

DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMASRTPEVTCVVVDVS
HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCRDKLT
KNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFF
LYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKG
GGGGGGGGGGGGGGDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKP
KDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPPE
EQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK
GQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQ
PENNYKTPPVLDSDGSFFLYSDLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEAL
HNHYTQKSLSLSPG (SEQ ID NO: 68).

14. Construto de Fc, de acordo com a reivindicação 2, **caracterizado** pelo fato de que cada um dentre o primeiro polipeptídeo e

o segundo polipeptídeo compreende a sequência
DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMASRTPEVTCVVVDVS
HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQD
WLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPVYTLPPCRDKLT
KNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPVLDSDGSFF
LYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKG
GGGGGGGGGGGGGGGGDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPK
KDTLMASRTPEVTCVVVDVS
HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKP
EQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK
GQPREPVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQ
PENNYKTPVLDSDGSFFLYSDLTVKSRWQQGNVFSCSVMHEAL
HNHYTQKSLSLSPG (SEQ ID NO: 69).

15. Construto de Fc, de acordo com a reivindicação 2, **caracterizado** pelo fato de que cada um dentre o primeiro polipeptídeo e o segundo polipeptídeo compreende a sequência
DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVS
HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKP
EQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK
GQPREPVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQ
PENNYKTPVLDSDGSFFLYSDLTVKSRWQQGNVFSCSVMHEAL
HNHYTQKSLSLSPG (SEQ ID NO: 71).

16. Construto de Fc, de acordo com a reivindicação 2, **caracterizado** pelo fato de que cada um dentre o primeiro polipeptídeo e o segundo polipeptídeo compreende a sequência
DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVS

HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTPPEEQYNSTYRVSVLTVLHQDWLN
 GKEYKCKVSNKALPAPIEKTIKGQPREPVYTLPPCRDKLT
 KNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFF
 LYSKLTVDKSRWQQGNVFSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKGGGG
 GGGGGGGGGGGGGGGDKTHTCPCPAPELLGGPSVFLFPPKPK
 KDTLMASRTPEVTCVVVDVSHEDEVKFNWYVDGVEVHNAKTPRE
 EQYNSTYRVSVLTVLHQDWLN
 GKEYKCKVSNKALPAPIEKTIKGQPREPVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQ
 PENNYKTTPPVLKSDGSFFLYSDLTVKSRWQQGNVFSCVMHEAL
 HNHYTQKSLSLSPG (SEQ ID NO: 72).

17. Construto de Fc, de acordo com a reivindicação 2, **caracterizado** pelo fato de que cada um dentre o primeiro polipeptídeo e o segundo polipeptídeo compreende a sequência

D
 K
 T
 H
 T
 C
 P
 C
 P
 A
 P
 E
 L
 L
 G
 G
 P
 S
 V
 F
 L
 F
 P
 P
 K
 P
 K
 D
 T
 L
 M
 A
 S
 R
 T
 P
 E
 V
 T
 C
 V
 V
 V
 D
 V
 S
 H
 E
 D
 P
 E
 V
 K
 F
 N
 W
 Y
 V
 D
 G
 V
 E
 V
 H
 N
 A
 K
 T
 K
 P
 P
 E
 E
 Q
 Y
 N
 S
 T
 Y
 R
 V
 V
 S
 V
 L
 T
 V
 L
 H
 Q
 D
 W
 L
 N
 G
 K
 E
 Y
 K
 C
 K
 V
 S
 N
 K
 A
 L
 P
 A
 P
 I
 E
 K
 T
 I
 S
 K
 A
 K
 G
 Q
 P
 R
 E
 P
 Q
 V
 Y
 T
 L
 P
 P
 S
 R
 D
 E
 L
 T
 K
 N
 Q
 V
 S
 L
 T
 C
 L
 V
 K
 G
 F
 Y
 P
 S
 D
 I
 A
 V
 E
 W
 E
 S
 N
 G
 Q
 P
 E
 N
 N
 Y
 K
 T
 T
 P
 P
 V
 L
 K
 S
 D
 G
 S
 F
 F
 L
 Y
 S
 D
 L
 T
 V
 D
 K
 S
 R
 W
 Q
 Q
 G
 N
 V
 F
 S
 C
 V
 M
 H
 E
 A
 L
 H
 N
 H
 Y
 T
 Q
 K
 S
 L
 S
 P
 G
 (SEQ ID NO: 74).

18. Construto de Fc, de acordo com a reivindicação 2, **caracterizado** pelo fato de que cada um dentre o primeiro polipeptídeo e o segundo polipeptídeo compreende a sequência

D
 K
 T
 H
 T
 C
 P
 C
 P
 A
 P
 E
 L
 L
 G
 G
 P
 S
 V
 F
 L
 F
 P
 P
 K
 P
 K
 D
 T
 L
 M
 A
 S
 R
 T
 P
 E
 V
 T
 C
 V
 V
 V
 D
 V
 S
 H
 E
 D
 P
 E
 V
 K
 F
 N
 W
 Y
 V
 D
 G
 V
 E
 V
 H
 N
 A
 K
 T
 K
 P
 P
 E
 E
 Q
 Y
 N
 S
 T
 Y
 R
 V
 V
 S
 V
 L
 T
 V
 L
 H
 Q
 D
 W
 L
 N
 G
 K
 E
 Y
 K
 C
 K
 V
 S
 N
 K
 A
 L
 P
 A
 P
 I
 E
 K
 T
 I
 S
 K
 A
 K
 G
 Q
 P
 R
 E
 P
 Q
 V
 Y
 T
 L
 P
 P
 C
 R
 D
 K
 L
 T

KNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFF
LYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKG
GGGGGGGGGGGGGGGGDKHTCPCPAPELLGGPSVFLFPPKP
KDTLMASRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKP
RE EQYNSTYRVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK
GQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQ
PENNYKTTPPVLKSDGSFFLYSDLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEAL
HNHYTQKSLSLSPG (SEQ ID NO: 75).

19. Construto de Fc, de acordo com a reivindicação 2, **caracterizado** pelo fato de que cada um dentre o primeiro polipeptídeo e o segundo polipeptídeo compreende a sequência
DKHTCPCPAPELLGGPSVFLFPPKPDKTLMISRTPEVTCVVVDVS
HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPPEEQYNSTYRVSVLTVLHQD
WLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCRDKLT
KNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFF
LYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKG
GGGGGGGGGGGGGGDKHTCPCPAPELLGGPSVFLFPPKP
KDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKP
PE EQYNSTYRVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK
GQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQ
PENNYKTTPPVLKSDGSFFLYSDLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEAL
HNHYTQKSLSLSPG (SEQ ID NO: 76).

20. Construto de Fc, de acordo com a reivindicação 2, **caracterizado** pelo fato de que cada um dentre o primeiro polipeptídeo e o segundo polipeptídeo compreende a sequência
DKHTCPCPAPELLGGPSVFLFPPKPDKTLMISRTPEVTCVVVDVS
HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPPEEQYNSTYRVSVLTVLHQD
WLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCRDKLT
KNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFF
LYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKG
GGGGGGGGGGGGDKHTCPCPAPELLGGPSVFLFPPKP

GGGGGGGGGGGGGGGGDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLPPKP
KDTLMASRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTPPE
EQYNSTYRVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIKAK
GQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQ
PENNYKTPPVLSKSDGSFFLYSDLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEAL
HNHYTQKSLSLSPG (SEQ ID NO: 77).

21. Construto de Fc, de acordo com a reivindicação 2, **caracterizado** pelo fato de que cada um dentre o primeiro polipeptídeo e o segundo polipeptídeo compreende a sequência

DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMASRTPEVTCVVVDVS
HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTPPEEQYNSTYRVSVLTVLHQD
WLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIKAKGQPREPQVYTLPPCRDKLT
KNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFF
LYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKG
GGGGGGGGGGGGGGGGDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKP
KDTLMASRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTPPE
EQYNSTYRVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIKAK
GQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQ
PENNYKTPPVLSKSDGSFFLYSDLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEAL
HNHYTQKSLSLSPG (SEQ ID NO: 79).

22. Construto de Fc, de acordo com a reivindicação 2, **caracterizado** pelo fato de que cada um dentre o terceiro polipeptídeo e o quarto polipeptídeo compreende uma sequência de

DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMASRTPEVTCVVVDVS
HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTPPEEQYNSTYRVSVLTVLHQD
WLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIKAKGQPREPQVCTLPPSRDELT
KNQVSLSCAVDGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFF
LVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG (SEQ
ID NO: 73).

23. Construto de Fc, de acordo com a reivindicação 2, **ca-**

racterizado pelo fato de que cada um dentre o terceiro polipeptídeo e o quarto polipeptídeo compreende uma sequência de
DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVS
HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQD
WLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPVQCTLPPSRDELT
KNQVSLSCAVDGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFF
LVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG (SEQ ID NO: 61).

24. Construto de Fc, de acordo com a reivindicação 2, **caracterizado** pelo fato de que cada um dentre o terceiro polipeptídeo e o quarto polipeptídeo compreende uma sequência de
DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMASRTPEVTCVVVDVS
HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQD
WLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPVQCTLPPSRDELT
KNQVSLSCAVDGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFF
LVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG (SEQ ID NO: 63).

25. Construto de Fc, de acordo com a reivindicação 2, **caracterizado** pelo fato de que cada um dentre o terceiro polipeptídeo e o quarto polipeptídeo compreende uma sequência de
DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVS
HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTPPEEQYNSTYRVVSVLTVLHQD
WLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPVQCTLPPSRDELT
KNQVSLSCAVDGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFF
LVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG (SEQ ID NO: 70).

26. Construto de Fc, de acordo com a reivindicação 2, **caracterizado** pelo fato de que cada um dentre os primeiro e segundo polipeptídeos compreende a sequência
DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMASRTPEVTCVVVDVS

HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPPEEQYNSTYRVSVLTVLHQDWLN
 GKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPVYTLPPCRDKLT
 KNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFF
 LYSKLTVDKSRWQQGNVFSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKG
 GGGGGGGGGGGGGGGDKTHTCPCPAPELLGGPSVFLFPPK
 KDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPPEEQYNSTYRVSVLTVLHQDWLN
 GKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPVYTLPPCRDKLT
 KNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFF
 LYSKLTVDKSRWQQGNVFSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPG (SEQ ID NO: 78), e

cada um dentre o terceiro e quarto polipeptídeos compreende a sequência

DKTHTCPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVS
 HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPPEEQYNSTYRVSVLTVLHQDWLN
 GKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPVYTLPPCRDKLT
 KNQVSLSCAVDGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFF
 LYSKLTVDKSRWQQGNVFSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPG (SEQ ID NO: 73).

27. Construto de Fc, de acordo com a reivindicação 2, **caracterizado** pelo fato de que cada um dentre os primeiro e segundo polipeptídeos compreende a sequência

DKTHTCPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVS
 HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTPREEQYNSTYRVSVLTVLHQDWLN
 GKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPVYTLPPCRDKLT
 KNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFF
 LYSKLTVDKSRWQQGNVFSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKG
 GGGGGGGGGGGGGDKTHTCPCPAPELLGGPSVFLFPPK
 KDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPPEEQYNSTYRVSVLTVLHQDWLN
 GKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPVYTLPPCRDKLT
 KNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFF
 LYSKLTVDKSRWQQGNVFSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPG (SEQ ID NO: 78), e

PENNYKTPPVLKSDGSFFLYSDLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEAL
HNHYTQKSLSLSPG (SEQ ID NO: 49), e

cada um dentre o terceiro e quarto polipeptídeos compreende a sequência

DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVS
HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQD
WLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIISKAKGQPREPQVCTLPPSRDELT
KNQVSLSCAVDGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFF
LVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG (SEQ
ID NO: 61).

28. Construto de Fc, de acordo com a reivindicação 2, **caracterizado** pelo fato de que cada um dentre os primeiro e segundo polipeptídeos compreende a sequência

DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVS
HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQD
WLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIISKAKGQPREPQVYTLPPCRDKLT
KNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFF
LYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKG
GGGGGGGGGGGGGGGGDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPK
KDLMASRTPEVTCVVVDVSHEDEVKFNWYVDGVEVHNAKTPRE
EQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIISKAK
GQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQ
PENNYKTPPVVLKSDGSFFLYSDLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEAL
HNHYTQKSLSLSPG (SEQ ID NO: 62), e

cada um dentre o terceiro e quarto polipeptídeos compreende a sequência

DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVS
HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQD
WLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIISKAKGQPREPQVCTLPPSRDELT
KNQVSLSCAVDGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFF

LVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG (SEQ ID NO: 61).

29. Construto de Fc, de acordo com a reivindicação 2, **caracterizado** pelo fato de que cada um dentre os primeiro e segundo polipeptídeos compreende a sequência

DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMASRTPEVTCVVVDVS
HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPVYTLPPCRDKLT
KNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKG
GGGGGGGGGGGGGGGGDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKP
KDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTPRE
EQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK
GQPREPVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQ
PENNYKTPPVLDSDGSFFLYSDLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEAL
HNHYTQKSLSLSPG (SEQ ID NO: 64), e

cada um dentre o terceiro e quarto polipeptídeos compreende a sequência

DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMASRTPEVTCVVVDVS
HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPVCTLPPSRDELT
KNQVSLSCAVDGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFF
LVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG (SEQ ID NO: 63).

30. Construto de Fc, de acordo com a reivindicação 2, **caracterizado** pelo fato de que cada um dentre os primeiro e segundo polipeptídeos compreende a sequência

DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMASRTPEVTCVVVDVS
HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPVYTLPPCRDKLT

KNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFF
LYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKG
GGGGGGGGGGGGGGGGDKHTCPCPAPELLGGPSVFLFPPKP
KDTLMASRTPEVTCVVVDVSCHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKP
EQYNSTYRVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK
GQPREPVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQ
PENNYKTTPPVLKSDGSFFLYSDLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEAL
HNHYTQKSLSLSPG (SEQ ID NO: 65), e

cada um dentre o terceiro e quarto polipeptídeos compreende a sequência

DKTHTCPCPAPELLGGPSVFLFPPKPDKTLMASRTPEVTCVVVDVS
HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVSVLTVLHQD
WLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPVQCTLPPSRDELT
KNQVSLSCAVDGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFF
LVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG (SEQ
ID NO: 63).

31. Construto de Fc, de acordo com a reivindicação 2, **caracterizado** pelo fato de que cada um dentre os primeiro e segundo polipeptídeos compreende a sequência

DKTHTCPCPAPELLGGPSVFLFPPKPDKTLMISRTPEVTCVVVDVS
HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVSVLTVLHQD
WLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPVYTLPPCRDKLT
KNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFF
LYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKG
GGGGGGGGGGGGGGDKHTCPCPAPELLGGPSVFLFPPKP
KDTLMASRTPEVTCVVVDVSCHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKP
EQYNSTYRVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK
GQPREPVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQ
PENNYKTTPPVLKSDGSFFLYSDLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEAL
HNHYTQKSLSLSPG (SEQ ID NO: 67), e

cada um dentre o terceiro e quarto polipeptídeos compreende a sequênciа

DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVS
HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPVQVCTLPPSRDELT
KNQVSLSCAVDGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFF
LVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG (SEQ ID NO: 61).

32. Construto de Fc, de acordo com a reivindicação 2, **caracterizado** pelo fato de que cada um dentre os primeiro e segundo polipeptídeos compreende a sequênciа

DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMASRTPEVTCVVVDVS
HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPVQVYTLPPCRDKLT
KNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFF
LYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKG
GGGGGGGGGGGGGGGGDKTHCTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVS
HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPVQVYTLPPSRDEL
TKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSDLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG (SEQ ID NO: 68), e

cada um dentre o terceiro e quarto polipeptídeos compreende a sequênciа

DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMASRTPEVTCVVVDVS
HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPVQVCTLPPSRDELT
KNQVSLSCAVDGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFF
LVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG (SEQ ID NO: 63).

33. Construto de Fc, de acordo com a reivindicação 2, **caracterizado** pelo fato de que cada um dentre os primeiro e segundo polipeptídeos compreende a sequência

DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMASRTPEVTCVVVDVS
 HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPVYTLPPCRDKLT
 KNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKG
 GGGGGGGGGGGGGGGDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMASRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPPE
 EQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQ
 PENNYKTPVLDSDGSFFLYSDLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG (SEQ ID NO: 69), e

cada um dentre o terceiro e quarto polipeptídeos compreende a sequência

DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMASRTPEVTCVVVDVS
 HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPVYTLPPSRDELT
 KNQVSLSCAVDGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG (SEQ
 ID NO: 63).

34. Construto de Fc, de acordo com a reivindicação 2, **caracterizado** pelo fato de que cada um dentre os primeiro e segundo polipeptídeos compreende a sequência

DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVS
 HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPPEEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPVYTLPPCRDKLT
 KNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKG
 GGG

GGGGGGGGGGGGGGGGDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLPPKP
KDTLMASRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPRE
EQYNSTYRVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIKAK
GQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQ
PENNYKTPPVLSKSDGSFFLYSDLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEAL
HNHYTQKSLSLSPG (SEQ ID NO: 72), e

cada um dentre o terceiro e quarto polipeptídeos compreende a sequência

DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPDKDTLMISRTPEVTCVVVDVS
HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPPEEQYNSTYRVSVLTVLHQD
WLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIKAKGQPREPQVCTLPPSRDELT
KNQVSLSCAVDGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFF
LVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG (SEQ
ID NO: 70).

35. Construto de Fc, de acordo com a reivindicação 2, **caracterizado** pelo fato de que cada um dentre os primeiro e segundo polipeptídeos compreende a sequência

DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPDKDTLMASRTPEVTCVVVDVS
HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPPEEQYNSTYRVSVLTVLHQD
WLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIKAKGQPREPQVYTLPPCRDKLT
KNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFF
LYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKG
GGGGGGGGGGGGGGGGDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLPPKP
KDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPRE
EQYNSTYRVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIKAK
GQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQ
PENNYKTPPVLSKSDGSFFLYSDLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEAL
HNHYTQKSLSLSPG (SEQ ID NO: 74), e

cada um dentre o terceiro e quarto polipeptídeos compreende a sequência

DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMASRTPEVTCVVVDVS
HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPPEEQYNSTYRVVSVLTVLHQD
WLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPVQVCTLPPSRDELT
KNQVSLSCAVDGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFF
LVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG (SEQ
ID NO: 73).

36. Construto de Fc, de acordo com a reivindicação 2, **caracterizado** pelo fato de que cada um dentre os primeiro e segundo polipeptídeos compreende a sequência

DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMASRTPEVTCVVVDVS
HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPPEEQYNSTYRVVSVLTVLHQD
WLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPVQVYTLPPCRDKLT
KNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFF
LYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKG
GGGGGGGGGGGGGGGGDKHTCPCPAPELLGGPSVFLFPPKPK
KDTLMASRTPEVTCVVVDVS
HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPPEEQYNSTYRVVSVLTVLHQD
WLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPVQVYTLPPSRDEL
TKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQ
PENNYKTPPVLDSDGSFFLYSDLTVKSRWQQGNVFSCSVMHEAL
HNHYTQKSLSLSPG (SEQ ID NO: 75), e

cada um dentre o terceiro e quarto polipeptídeos compreende a sequência

DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMASRTPEVTCVVVDVS
HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPPEEQYNSTYRVVSVLTVLHQD
WLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPVQVCTLPPSRDELT
KNQVSLSCAVDGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFF
LVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG (SEQ
ID NO: 73).

37. Construto de Fc, de acordo com a reivindicação 2, **caracterizado** pelo fato de que cada um dentre os primeiro e segundo

polipeptídeos compreende a sequência

DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVS
HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPPEEQYNSTYRVVSVLTVLHQD
WLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPVYTLPPCRDKLT
KNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPVLDSDGSFF
LYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKG
GGGGGGGGGGGGGGGGDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPK
KDTLMASRTPEVTCVVVDVS
HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPPEEQYNSTYRVVSVLTVLHQD
WLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPVYTLPPCRDKLT
KNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPVLDSDGSFF
LYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
(SEQ ID NO: 77), e

cada um dentre o terceiro e quarto polipeptídeos compreende a sequência

DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVS
HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPPEEQYNSTYRVVSVLTVLHQD
WLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPVYTLPPCRDKLT
KNQVSLSCAVDGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPVLDSDGSFF
LYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG (SEQ
ID NO: 70).

38. Construto de Fc, de acordo com a reivindicação 2, **caracterizado** pelo fato de que cada um dentre os primeiro e segundo polipeptídeos compreende a sequência

DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMASRTPEVTCVVVDVS
HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPPEEQYNSTYRVVSVLTVLHQD
WLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPVYTLPPCRDKLT
KNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPVLDSDGSFF
LYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKG
GGGGGGGGGGGGGGDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPK
KDTLMASRTPEVTCVVVDVS
HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPPEEQYNSTYRVVSVLTVLHQD
WLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPVYTLPPCRDKLT
KNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPVLDSDGSFF
LYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
(SEQ ID NO: 77), e

EQYNSTYRVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTI
GQPREPQVTLPSSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQ
PENNYKTPVLSKSDGSFFLYSDLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEAL
HNHYTQKSLSLSPG (SEQ ID NO: 79), e

cada um dentre o terceiro e quarto polipeptídeos comprende a sequência

DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMASRTPEVTCVVVDVS
HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPPEEQYNSTYRVVSVLTVLHQD
WLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPVQLPPSRDELT
KNQVSLSCAVDGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPVLDSDGSFF
LVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG (SEQ
ID NO: 73).

39. Construto de Fc, de acordo com a reivindicação 2, **caracterizado** pelo fato de que cada um dentre os primeiro e segundo polipeptídeos compreende a sequência DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVS HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPPEEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCRDKLT KNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSSLSPGKGGSFGGGGGGGGGGGGGGGDKTHTCPPCPAPEELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVS SHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPPEEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSDLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSSLSPG (SEQ ID NO: 76), e

cada um dentre o terceiro e quarto polipeptídeos comprende a sequência

DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVS
HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPPEEQYNSTYRVVSVLTVLHQD

WLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIISKAKGQPREPQVCTLPPSRDELT
KNQVSLSCAVDGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPVLDSDGSFF
LVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG (SEQ
ID NO: 70).

40. Construto de Fc, de acordo com a reivindicação 2, **caracterizado** pelo fato de que é para uso na promoção da depuração de autoanticorpos, supressão da apresentação de抗ígenos, redução da resposta imune em um sujeito em necessidade, ou redução da ativação baseada em imunocomplexos da resposta imune.

41. Construto de Fc, de acordo com a reivindicação 2, **caracterizado** pelo fato de que é para uso no tratamento de uma doença inflamatória ou autoimune ou imunológica selecionada dentre artrite reumatoide (RA); lúpus eritematoso sistêmico (SLE); vasculite associada ao ANCA; síndrome do anticorpo antifosfolipídeo; anemia hemolítica autoimune; neuropatia desmielinizante inflamatória crônica; transplante de órgão; GVHD; dermatomiosite; Síndrome de Goodpasture; síndromes de hipersensibilidade tipo II direcionadas a órgãos e sistemas mediadas por citotoxicidade mediada por células e dependente de anticorpos, por exemplo, síndrome de Guillain Barre, CIDP, síndrome de Felty, rejeição mediada por anticorpo, doença autoimune da tireoide, colite ulcerativa, doença hepática autoimune; púrpura trombocitopenica idiopática; Miastenia Gravis, neuromielite óptica; pênfigo e outros distúrbios bolhosos autoimunes; Síndrome de Sjogren; citopenias autoimunes e outros distúrbios mediados por fagocitose dependente de anticorpo; trombocitopenia induzida por heparina (HIT); miose; polimiosite; amplificação dependente de anticorpo; síndrome da pessoa rígida; Doença de Kawasaki; miosite por corpos de inclusão; esclerose sistêmica; nefropatia por IgA; doença relacionada à IgG4; doença de Graves; doença autoimune do ouvido interno (AIED); síndrome antifosfolípide (APS); pênfigo vulgar; pênfigo foliáceo; penfigoi-

de gestacional; pênfigo paraneoplásico; neurite óptica, síndrome de Parry Romberg; síndromes inflamatórias dependentes de FcR; sinovite; glomerulite; e vasculite.

42. Composição **caracterizada** pelo fato de que é selecionada do grupo consistindo em:

(a) uma composição compreendendo: um polipeptídeo compreendendo ou consistindo em sequência:

DKTHTCPPCPAPELLGGPSVLFPPKPKDTLMASRTPEVTCVVVDVS
HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPPEEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPVYTLPPCRDKLT
KNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKG
GGGGGGGGGGGGGGGGDKTHTCPPCPAPELLGGPSVLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVS
HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPPEEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPVYTLPPSRDELT
KNQVSLSCAVDGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPVLDSDGSFFLYSDLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG (SEQ ID NO: 78), e

um polipeptídeo compreendendo ou consistindo na sequência:

DKTHTCPPCPAPELLGGPSVLFPPKPKDTLMASRTPEVTCVVVDVS
HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPPEEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPVCTLPPSRDELT
KNQVSLSCAVDGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPVLDSDGSFFLYSDLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG (SEQ ID NO: 73);

(b) uma composição compreendendo: um polipeptídeo compreendendo ou consistindo na sequência:

DKTHTCPPCPAPELLGGPSVLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVS
HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQD

WLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTI SKAKGQPREPQVYTLPPCRDKLT
KNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFF
LYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKG GG
GGGGGGGGGGGGGGGGDKTHTCPCPAPELLGGPSVFLFPPKP
KDTLMISRTPEVTCVVVDVS HEDPEVKNWYVDGVEVHNAKTKPRE
EQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTI SKAK
GQPREPQVYTLPPSRDELT KNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQ
PENNYKTTPPVLKSDGSFFLYSDLTVKSRWQQGNVFSCSVMHEAL
HNHYTQKSLSLSPG (SEQ ID NO: 49), e

polipeptídeo compreendendo ou consistindo na sequência:
DKTHTCPCPAPELLGGPSVFLFPPKP KDTLMISRTPEVTCVVVDVS
HEDPEVKNWYVDGVEVHNAKTKPRE EQYNSTYRVVSVLTVLHQD
WLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTI SKAKGQPREPQVCTLPPSRDELT
KNQVSLSCAVDGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFF
LVS KLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG (SEQ
ID NO: 61);

(c) uma composição compreendendo: um polipeptídeo
compreendendo ou consistindo na sequência:

DKTHTCPCPAPELLGGPSVFLFPPKP KDTLMISRTPEVTCVVVDVS
HEDPEVKNWYVDGVEVHNAKTKPRE EQYNSTYRVVSVLTVLHQD
WLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTI SKAKGQPREPQVYTLPPCRDKLT
KNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFF
LYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKG GG
GGGGGGGGGGGGGGDKTHTCPCPAPELLGGPSVFLFPPKP
KDTLMASRTPEVTCVVVDVS HEDPEVKNWYVDGVEVHNAKTKPRE
EQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTI SKAK
GQPREPQVYTLPPSRDELT KNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQ
PENNYKTTPPVLKSDGSFFLYSDLTVKSRWQQGNVFSCSVMHEAL
HNHYTQKSLSLSPG (SEQ ID NO: 62), e

polipeptídeo compreendendo ou consistindo na sequência:

DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVS
HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQD
WLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIISKAKGQPREPVQVCTLPPSRDELT
KNQVSLSCAVDGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFF
LVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG (SEQ
ID NO: 61);

(d) uma composição compreendendo: um polipeptídeo
compreendendo ou consistindo na sequência:

DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMASRTPEVTCVVVDVS
HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQD
WLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIISKAKGQPREPVQVYTLPPCRDKLT
KNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFF
LYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKG
GGGGGGGGGGGGGGGGDKHTCPCPAPELLGGPSVFLFPPKPK
KDTLMISRTPEVTCVVVDVS
HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQD
WLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIISKAKGQPREPVQVCTLPPSRDELT
KNQVSLSCAVDGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFF
LVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG (SEQ ID NO: 64), e

polipeptídeo compreendendo ou consistindo na sequência:

DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMASRTPEVTCVVVDVS
HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQD
WLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIISKAKGQPREPVQVCTLPPSRDELT
KNQVSLSCAVDGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFF
LVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG (SEQ
ID NO: 63);

(e) uma composição compreendendo: um polipeptídeo
compreendendo ou consistindo na sequência:

DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMASRTPEVTCVVVDVS
HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQD

WLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIISKAKGQPREPQVYTLPPCRDKLT
KNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFF
LYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKG
GGGGGGGGGGGGGGGGDKHTCPCPAPELLGGPSVFLFPPKP
KDTLMASRTPEVTCVVVDVSHEDEPKFNWYV
DGVEVHNAKTKPRE
EQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTI
SKAK
GQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQ
PENNYKTPPVLDSDGSFFLYSDLTV
DKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG (SEQ ID NO: 65), e

um polipeptídeo compreendendo ou consistindo na sequência:

DKTHTCPCPAPELLGGPSVFLFPPKP
KDTLMASRTPEVTCVVVDVS
HEDPEV
KFNWYV
DGVEVHNAKTKPRE
EQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTI
SKAK
GQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQ
PENNYKTPPVLDSDGSFFLYSDLTV
DKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG (SEQ ID NO: 63);

(f) uma composição compreendendo um polipeptídeo compreendendo ou consistindo na sequência:

DKTHTCPCPAPELLGGPSVFLFPPKP
KDTLMISRTPEVTCVVVDVS
HEDPEV
KFNWYV
DGVEVHNAKTKPRE
EQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTI
SKAK
GQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQ
PENNYKTPPVLDSDGSFFLYSDLTV
DKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG (SEQ ID NO: 67), e

polipeptídeo compreendendo ou consistindo na sequência:
DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVS
HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTPREEQYNSTYRVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPVQVCTLPPSRDELT
KNQVSLSCAVDGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFF
LVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG (SEQ ID NO: 61);

(g) uma composição compreendendo um polipeptídeo compreendendo ou consistindo na sequência:

DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMASRTPEVTCVVVDVS
HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTPREEQYNSTYRVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPVQVYTLPPCRDKLT
KNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFF
LYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKG
GGGGGGGGGGGGGGGGDKHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTPPE
EQYNSTYRVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPVQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQ
PENNYKTPPVLDSDGSFFLYSDLTVKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG (SEQ ID NO: 68), e

polipeptídeo compreendendo ou consistindo na sequência:
DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMASRTPEVTCVVVDVS
HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTPREEQYNSTYRVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPVQVCTLPPSRDELT
KNQVSLSCAVDGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFF
LVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG (SEQ ID NO: 63);

(h) uma composição compreendendo um polipeptídeo compreendendo ou consistindo na sequência:

DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMASRTPEVTCVVVDVS

HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTPREEQYNSTYRVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTI
SKAKGQPREPQVYTLPPCRDKLTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFF
LYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSSLSPGKG
GGGGGGGGGGGGGGGGDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKP
KDTLMASRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTPPE
EQYNSTYRVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTI
SKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQ
PENNYKTTPPVLKSDGSFFLYSDLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEAL
HNHYTQKSLSSLSPG (SEQ ID NO: 69), e

polipeptídeo compreendendo ou consistindo na sequência:
DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMASRTPEVTCVVVDVS
HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQD
WLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIISKAKGQQREPQVCTLPPSRDELT
KNQVSLSCAVDGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFF
LVSKLTVDKSRWQQGNVFCSVHEALHNHYTQKSLSLSPG (SEQ
ID NO: 63);

(i) uma composição compreendendo um polipeptídeo compreendendo ou consistindo na sequência:

DKTHCPPCPAPELLGGPSVFLPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVS
HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPPEEQYNSTYRVSVLTVLHQD
WLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIISKAKGQPREPQVYTLPPCRDKLT
KNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFF
LYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSSLSPGKG
GGGGGGGGGGGGGGGGDKTHCPPCPAPELLGGPSVFLPPK
KDTLMASRTPEVTCVVVDVSCHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKT
KPREEQYNSTYRVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPI
EKTIISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFY
PSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSDLTV
DKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSSLSPG (SEQ ID NO: 72), e

polipeptídeo compreendendo ou consistindo na sequência:
DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVS
HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPPEEQYNSTYRVVSVLTVLHQD
WLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIISKAKGQPREPVQVCTLPPSRDELT
KNQVSLSCAVDGYPDIAVEWESNGQPENNYKTPVLDSDGSFF
LVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG (SEQ
ID NO: 70);

(j) uma composição compreendendo um polipeptídeo com-
preendendo ou consistindo na sequência:

DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMASRTPEVTCVVVDVS
HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPPEEQYNSTYRVVSVLTVLHQD
WLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIISKAKGQPREPVQVYTLPPCRDKLT
KNQVSLWCLVKGFYPDIAVEWESNGQPENNYKTPVLDSDGSFF
LYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKG
GGGGGGGGGGGGGGGGDKHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPK
KDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPRE
EQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIISKAK
GQPREPVQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPDIAVEWESNGQ
PENNYKTPVLDSDGSFFLYSDLTVKSRWQQGNVFSCSVMHEAL
HNHYTQKSLSLSPG (SEQ ID NO: 74), e

polipeptídeo compreendendo ou consistindo na sequência:
DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMASRTPEVTCVVVDVS
HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPPEEQYNSTYRVVSVLTVLHQD
WLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIISKAKGQPREPVQVCTLPPSRDELT
KNQVSLSCAVDGYPDIAVEWESNGQPENNYKTPVLDSDGSFF
LVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG (SEQ
ID NO: 73);

(k) uma composição compreendendo um polipeptídeo com-
preendendo ou consistindo na sequência:

DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMASRTPEVTCVVVDVS

HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPPEEQYNSTYRVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVTLPPICRDKLT
KNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKG
GGGGGGGGGGGGGGGGDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMASRTPEVTCVVVDVS
EQYNSTYRVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVTLPPICRDKLT
GQPREPVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPG (SEQ ID NO: 75), e

polipeptídeo compreendendo ou consistindo na sequência:
DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMASRTPEVTCVVVDVS
HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPPEEQYNSTYRVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQP
REPQVTLPPICRDKLT
KNQVSLSCAVDGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPG (SEQ ID NO: 73);

(I) uma composição compreendendo um polipeptídeo compreendendo ou consistindo na sequência:

DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVS
HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPPEEQYNSTYRVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQP
REPQVTLPPICRDKLT
KNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKG
GGGGGGGGGGGGGGDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMASRTPEVTCVVVDVS
EQYNSTYRVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQP
REPQVTLPPICRDKLT
GQPREPVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPG (SEQ ID NO: 77), e

polipeptídeo compreendendo ou consistindo na sequência:
DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVS
HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTPPEEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPVQVCTLPPSRDELT
KNQVSLSCAVDGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFF
LVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG (SEQ ID NO: 70);

(m) uma composição compreendendo um polipeptídeo compreendendo ou consistindo na sequência:

DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMASRTPEVTCVVVDVS
HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTPPEEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPVQVYTLPPCRDKLT
KNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFF
LYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKG
GGGGGGGGGGGGGGGGDKHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMASRTPEVTCVVVDVS
HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTPPEEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPVQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFF
LVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG (SEQ ID NO: 79), e

polipeptídeo compreendendo ou consistindo na sequência:
DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMASRTPEVTCVVVDVS
HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTPPEEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPVQVCTLPPSRDELT
KNQVSLSCAVDGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFF
LVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG (SEQ ID NO: 73); e

(n) uma composição compreendendo um polipeptídeo compreendendo ou consistindo na sequência:

DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVS

HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPPEEQYNSTYRVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPVYTLPPCRDKLT
KNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKG
GGGGGGGGGGGGGGGGDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPPE
EQYNSTYRVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQ
PENNYKTTPPVLKSDGSFFLYSDLTVKSRWQQGNVFSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPG (SEQ ID NO: 76), e

polipeptídeo compreendendo ou consistindo na sequência:
DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPPEEQYNSTYRVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQ
PENNYKTTPPVLKSDGSFFLYSDLTVKSRWQQGNVFSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPG (SEQ ID NO: 70).

FIG. 1
(construtos de Fc 1, 2, e 3)

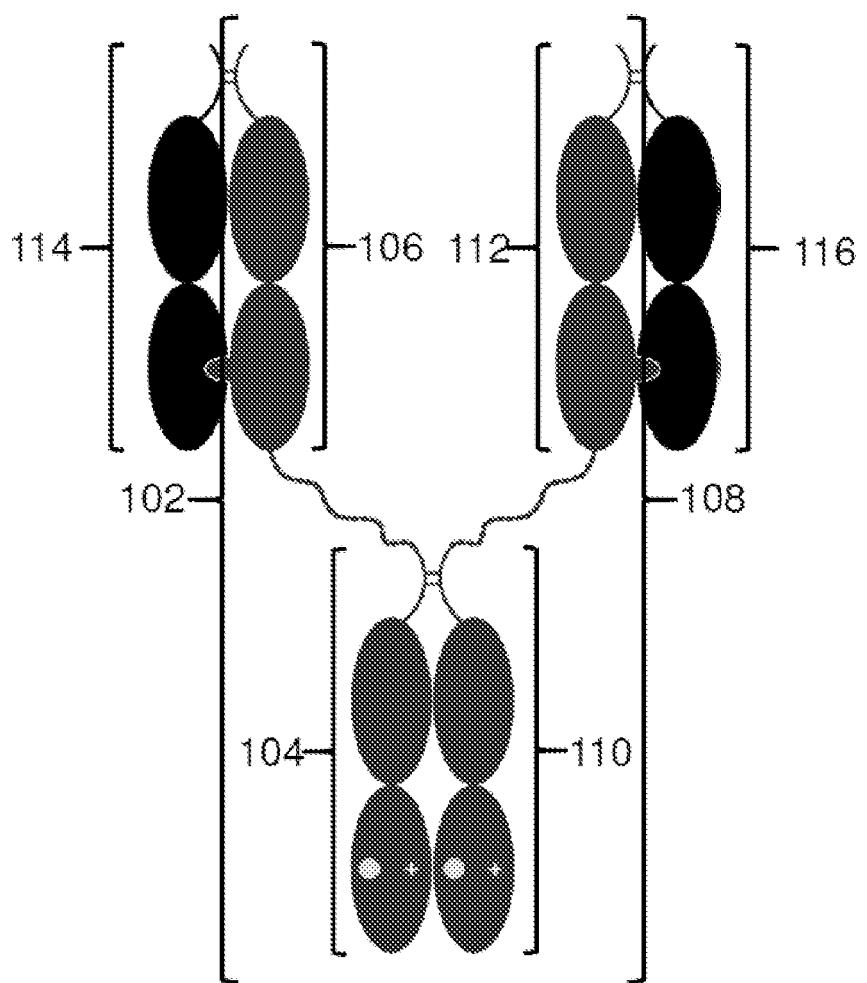


FIG. 2
(construto de Fc 4)

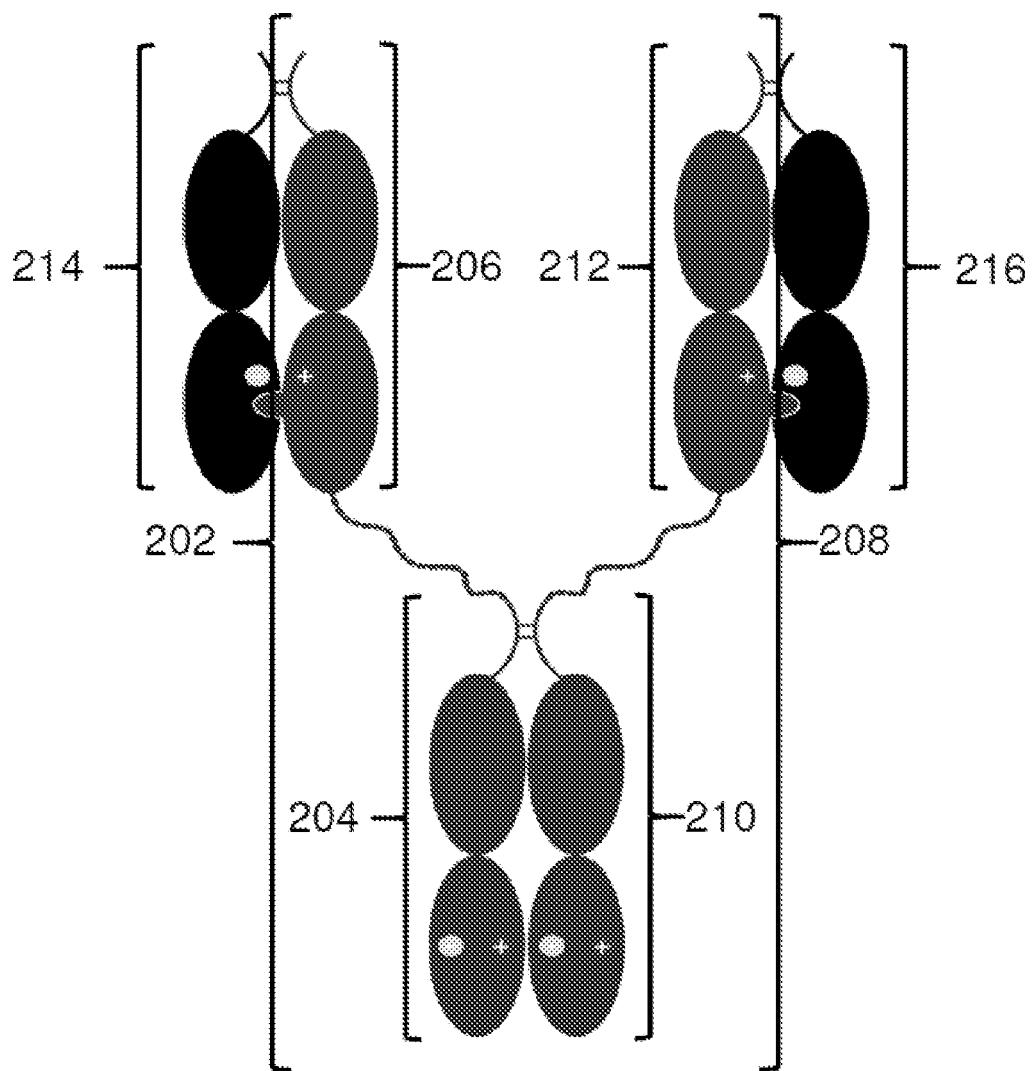


FIG. 3

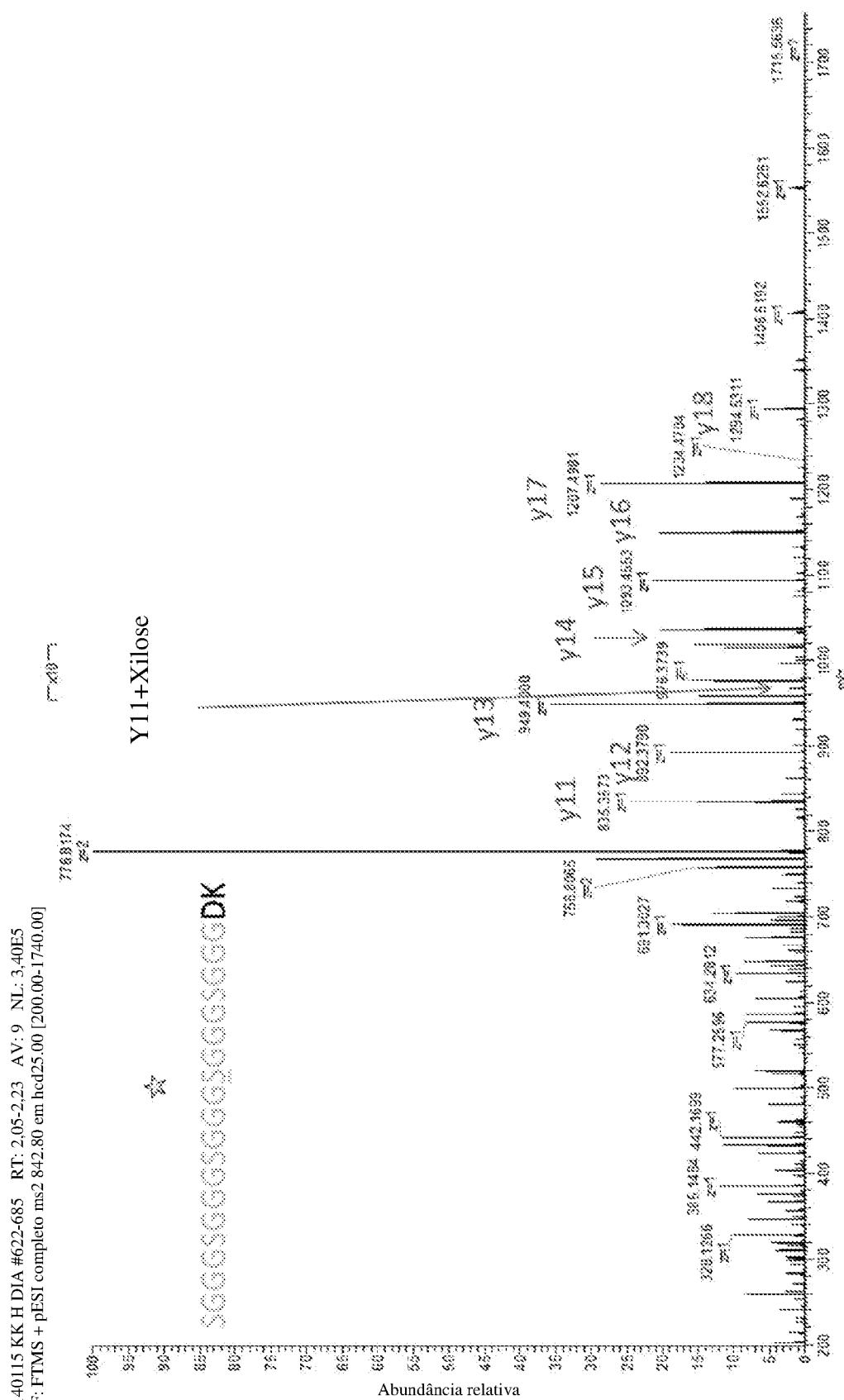


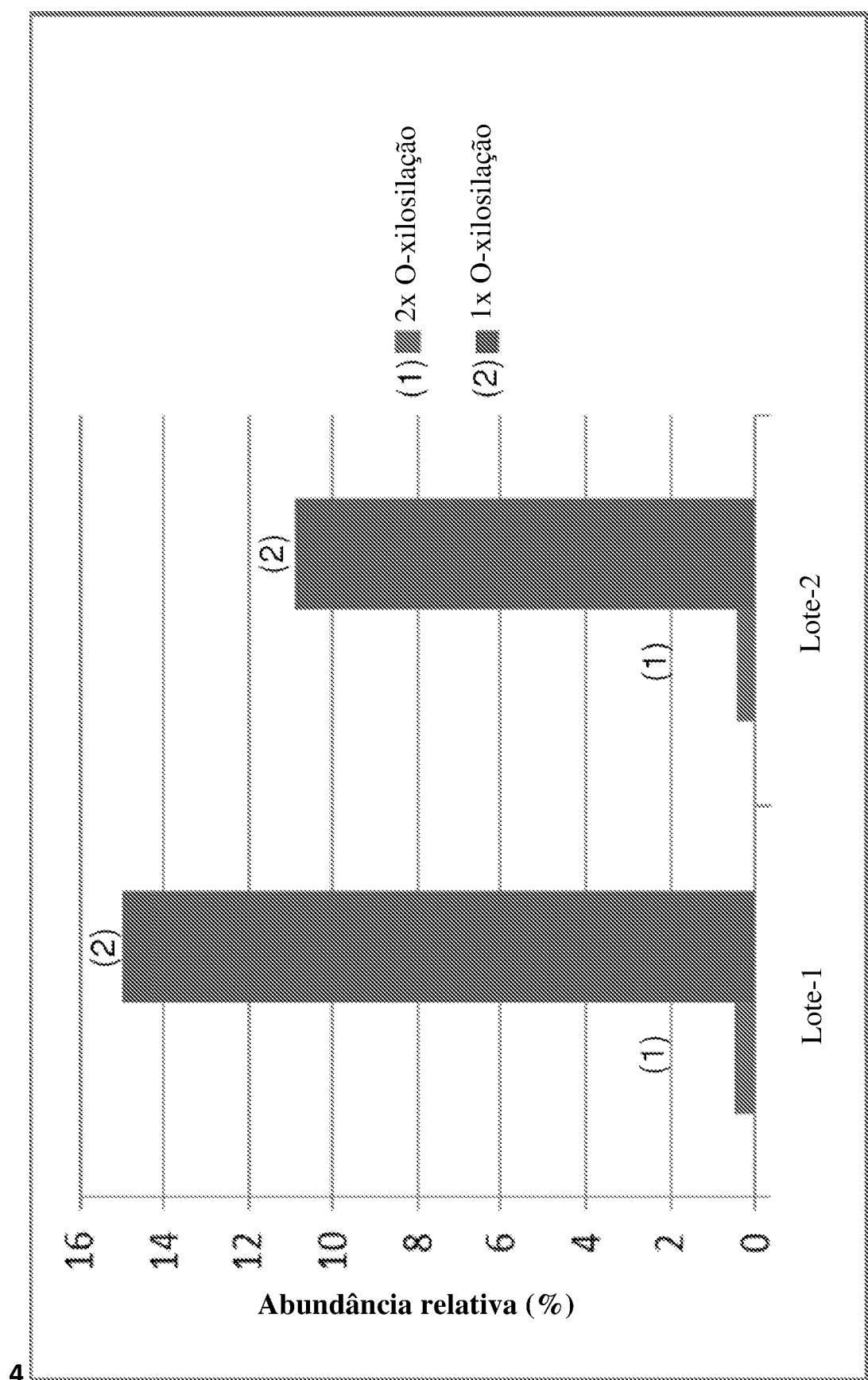
FIG. 4

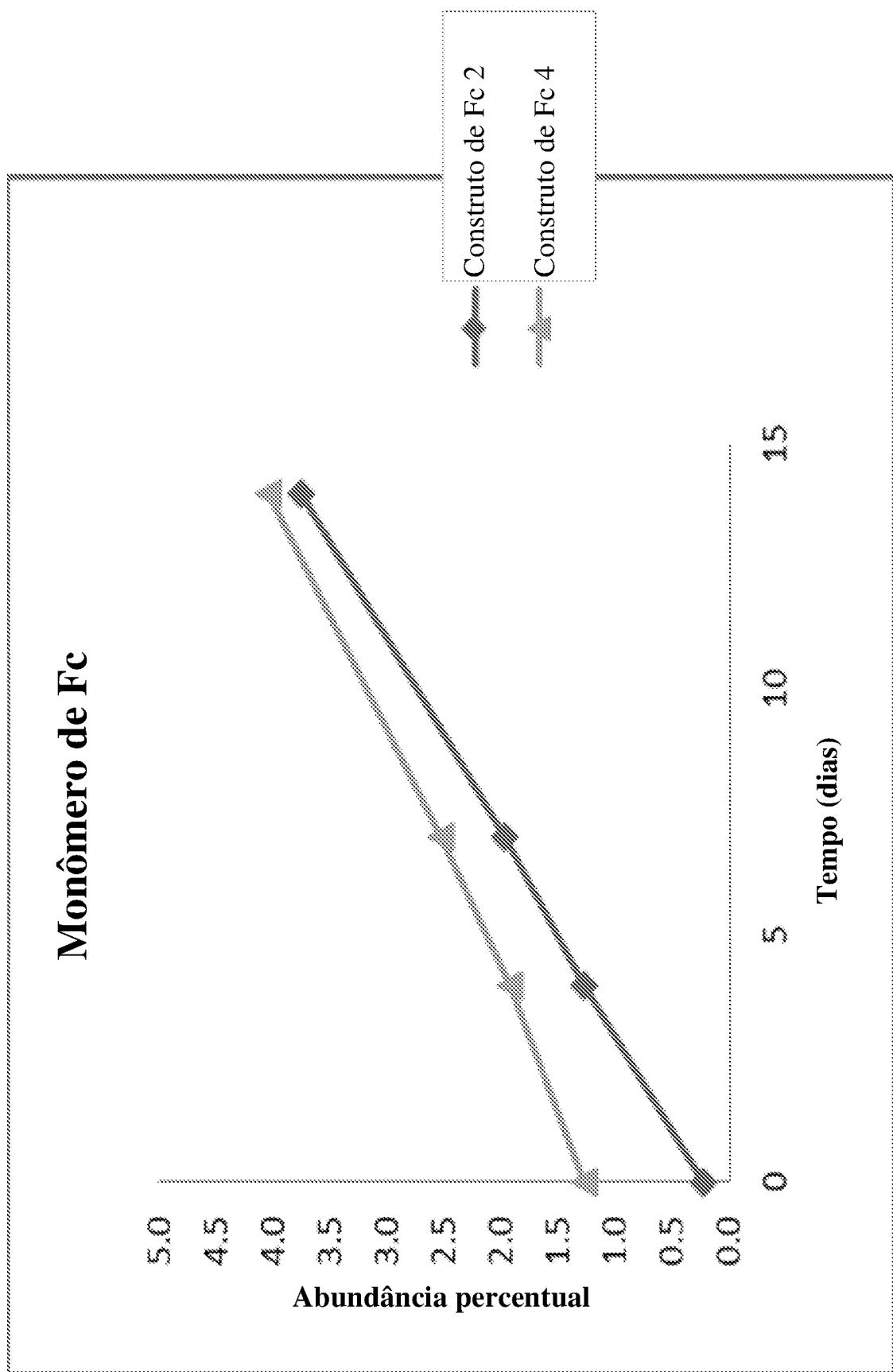
FIG. 5

FIG. 6

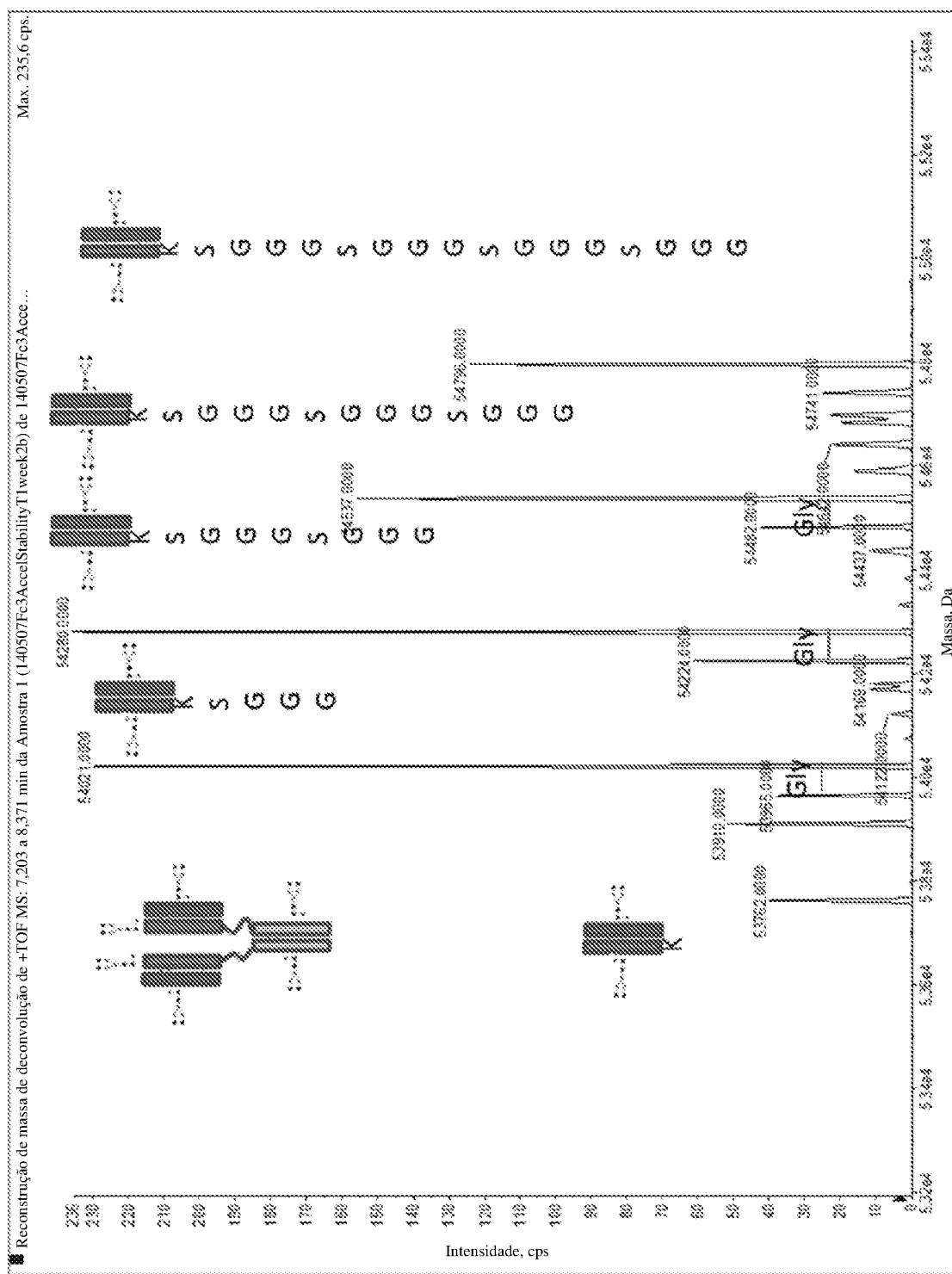


FIG. 7

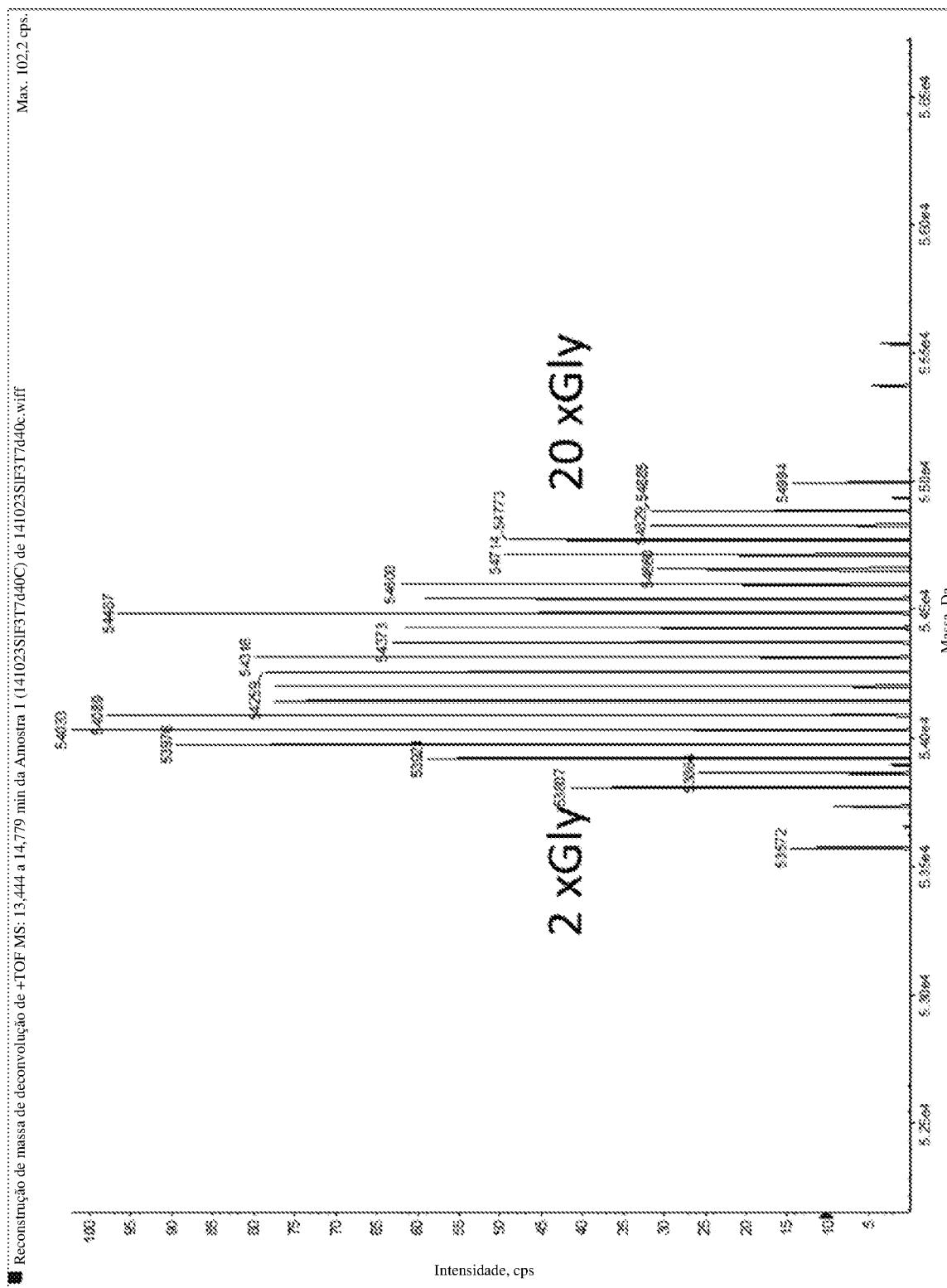


FIG. 8

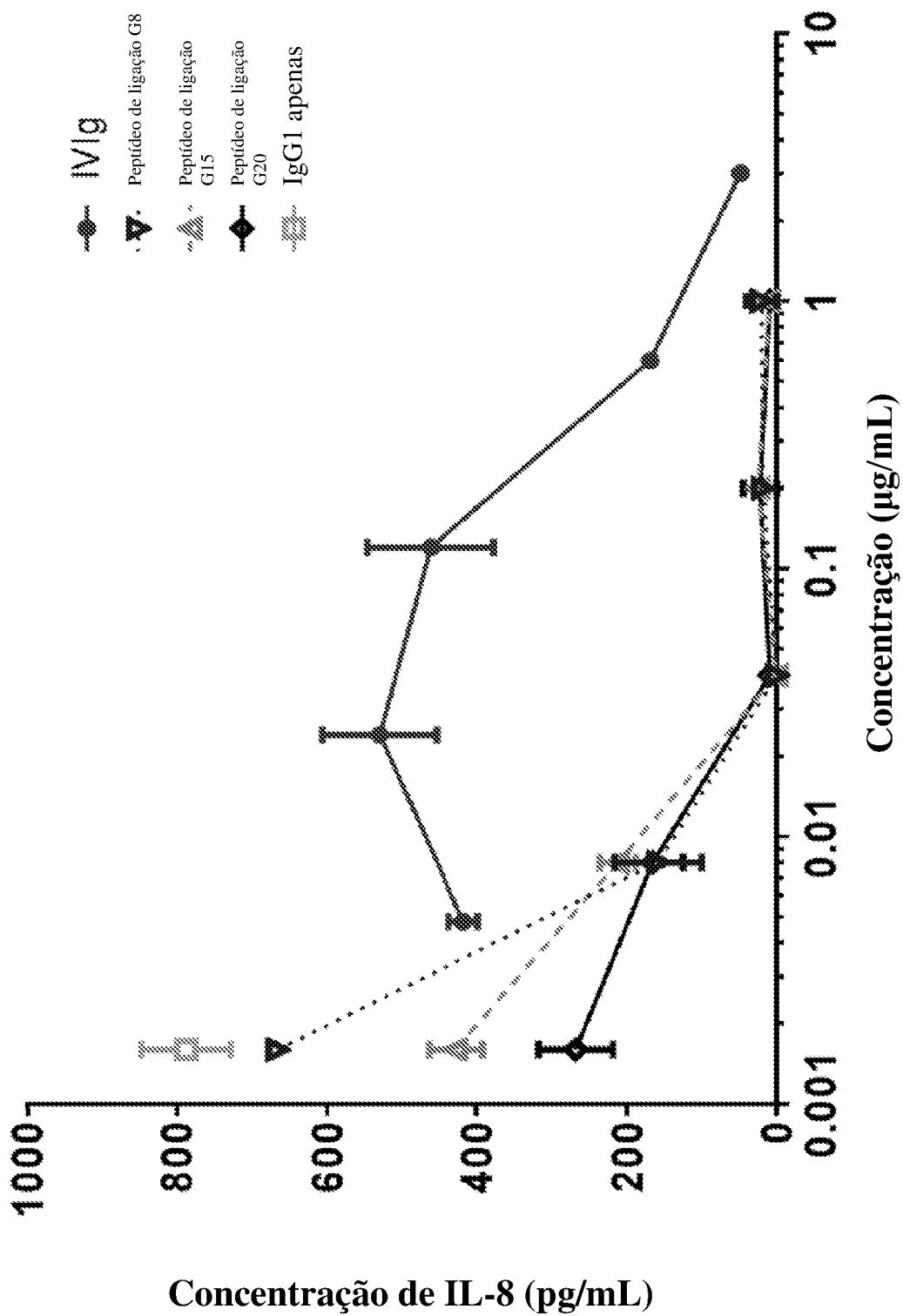


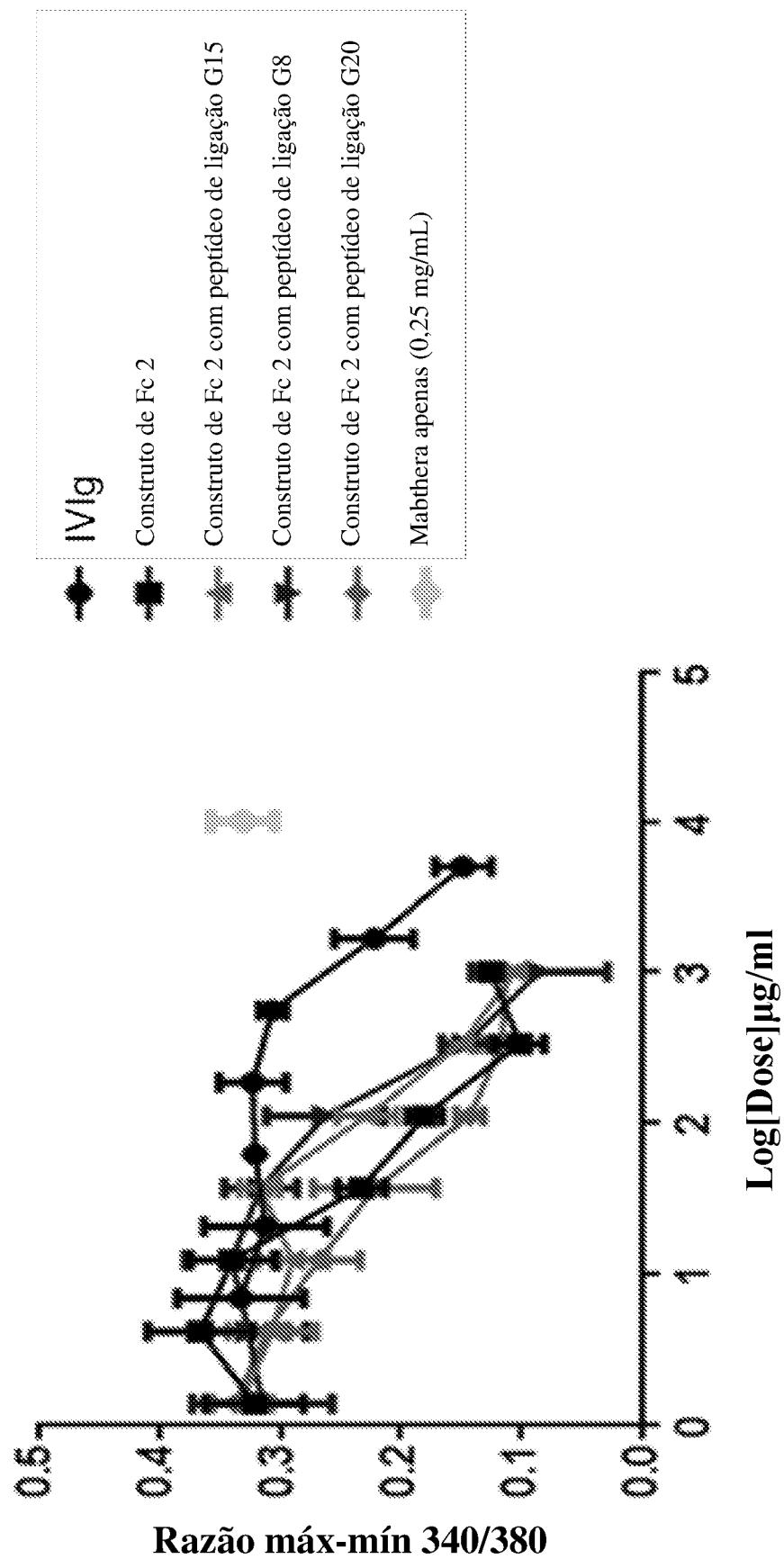
FIG. 9

FIG. 10

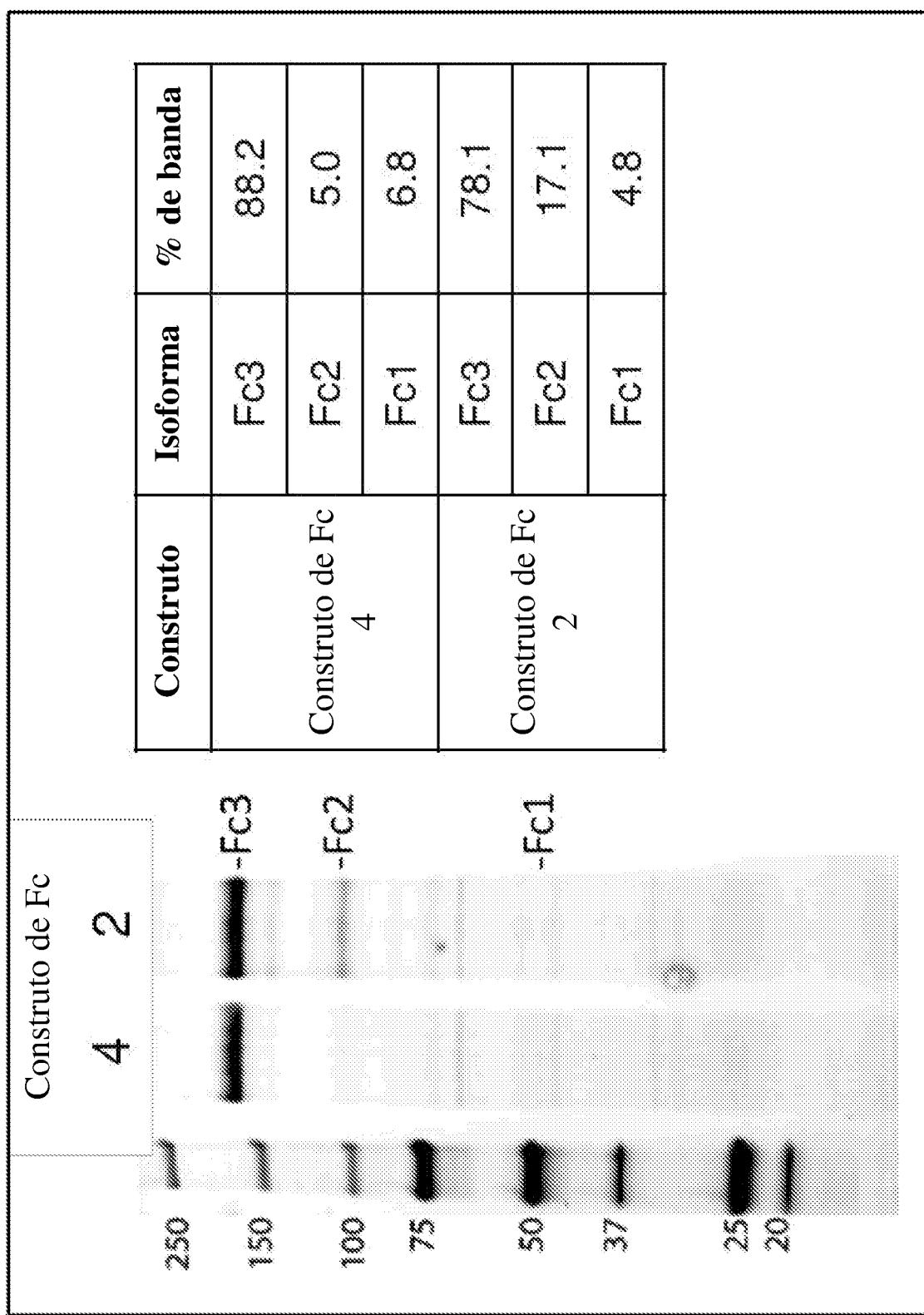


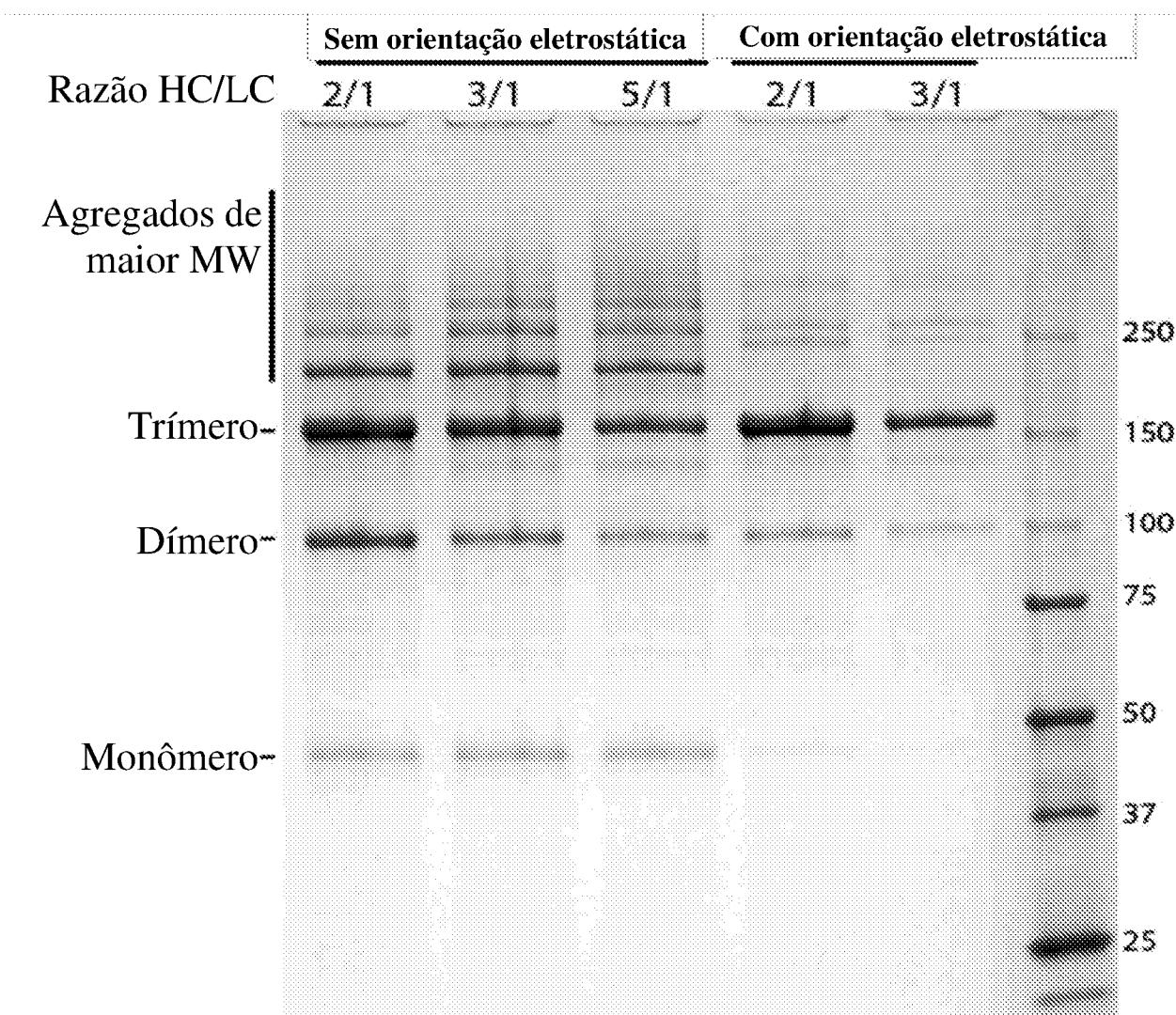
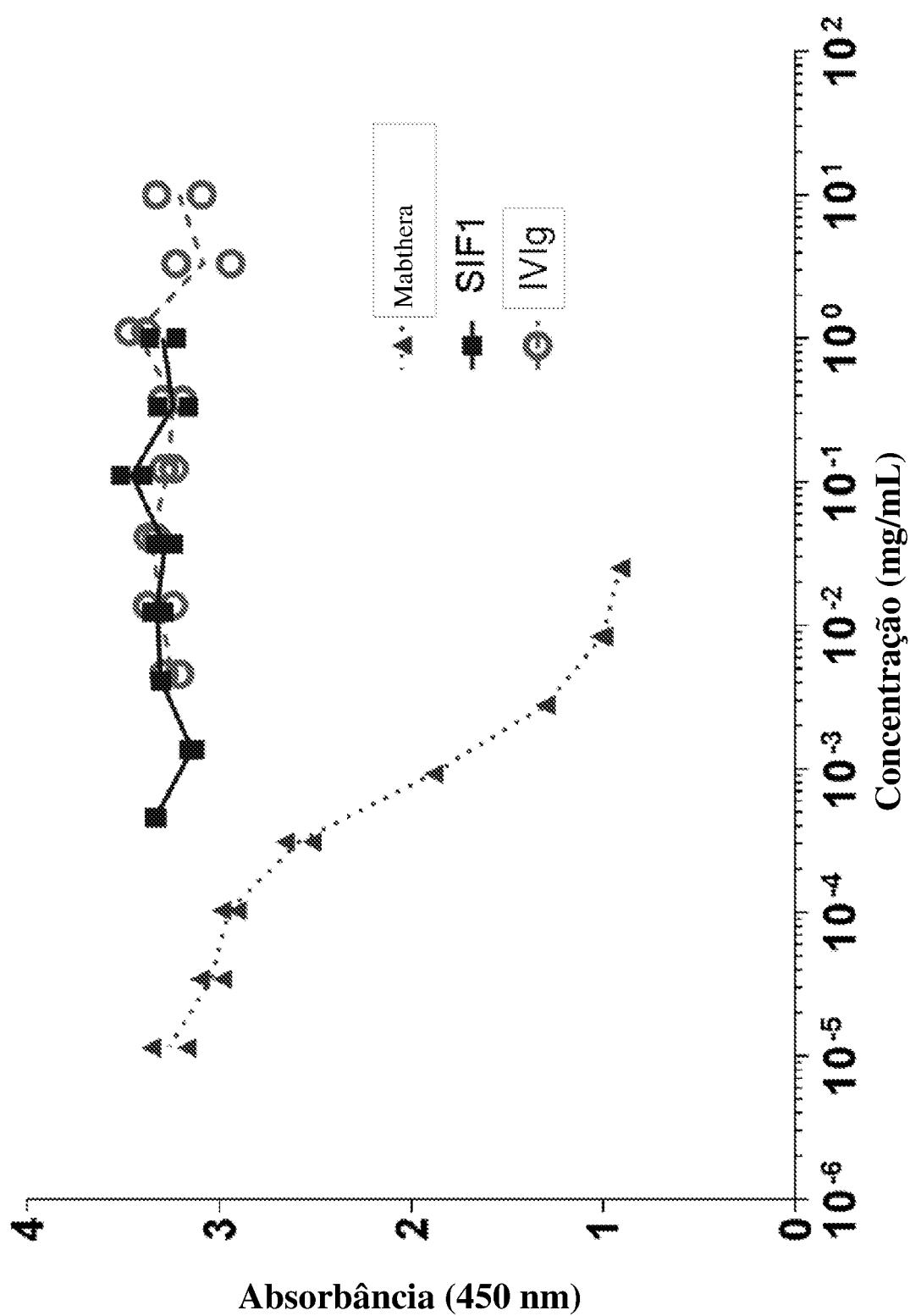
FIG. 11

FIG. 12



Absorbância (450 nm)

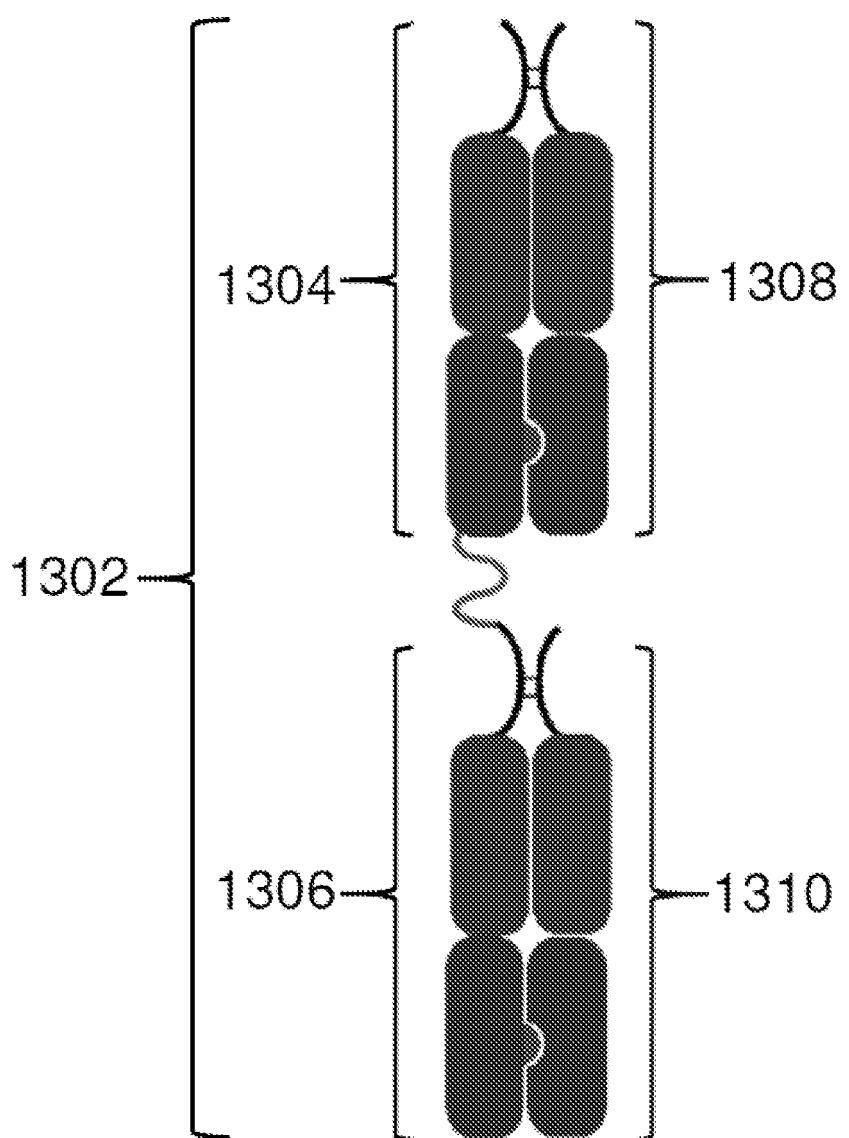
FIG. 13

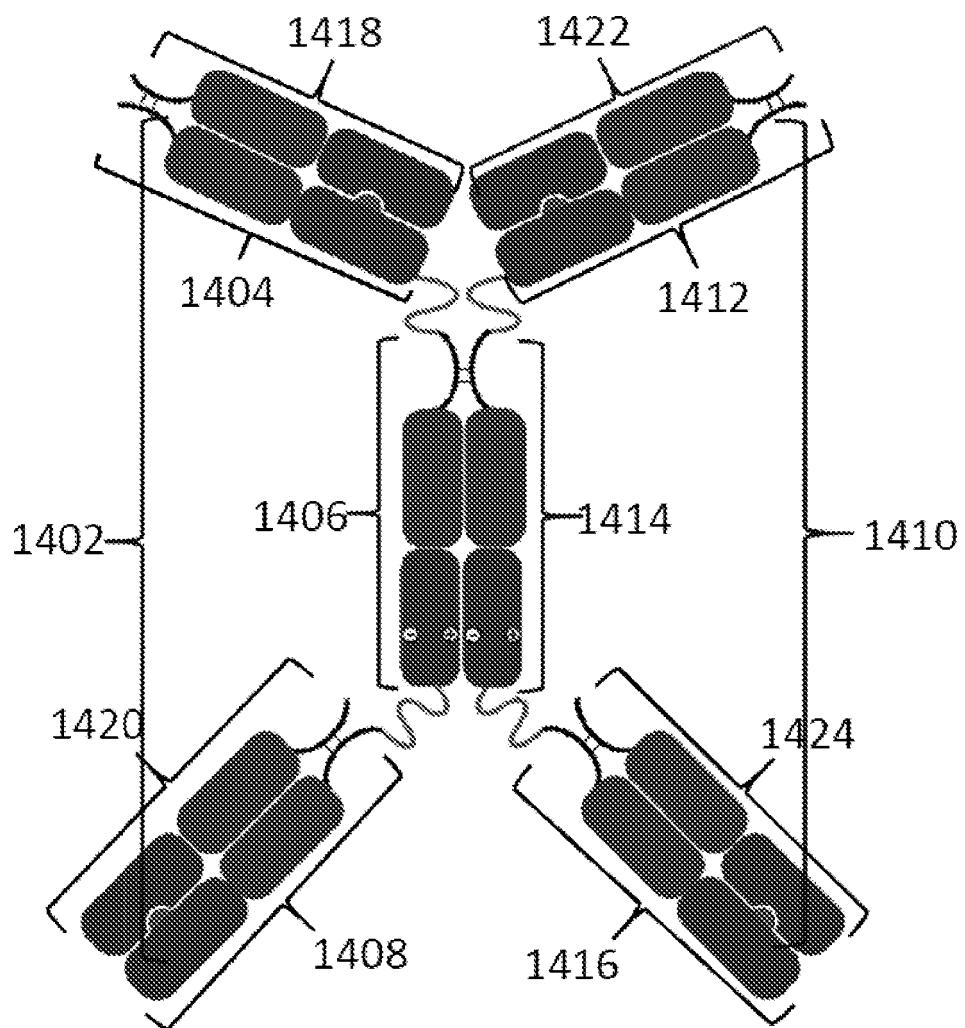
FIG. 14

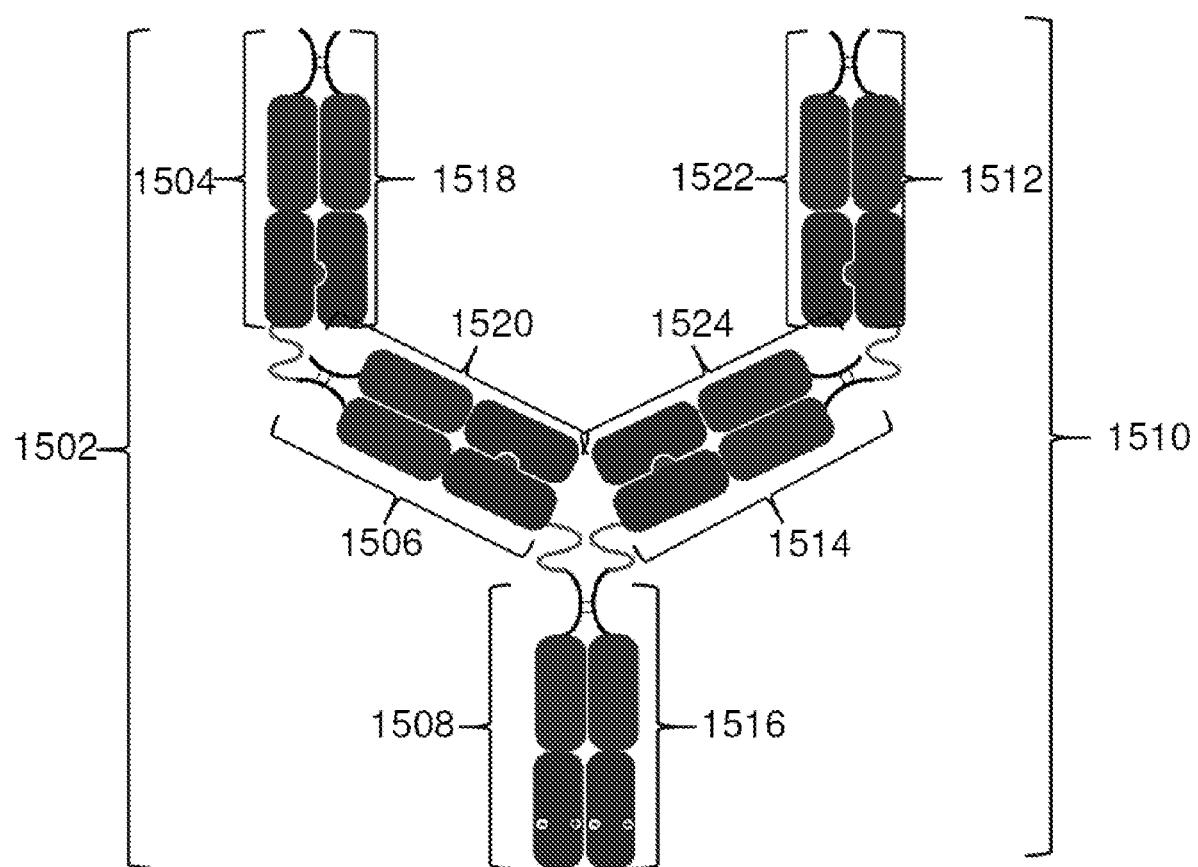
FIG. 15

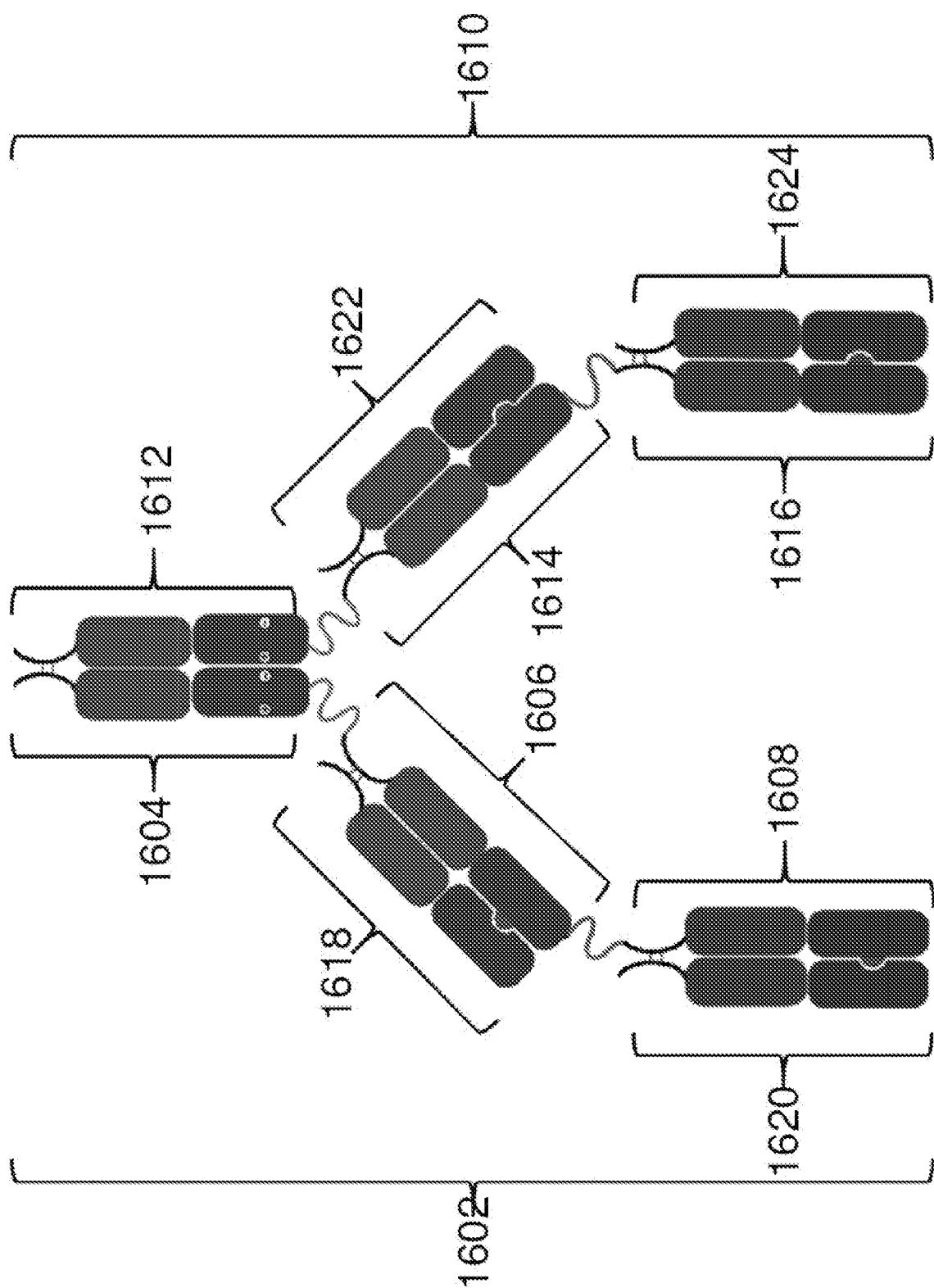
FIG. 16

FIG. 17

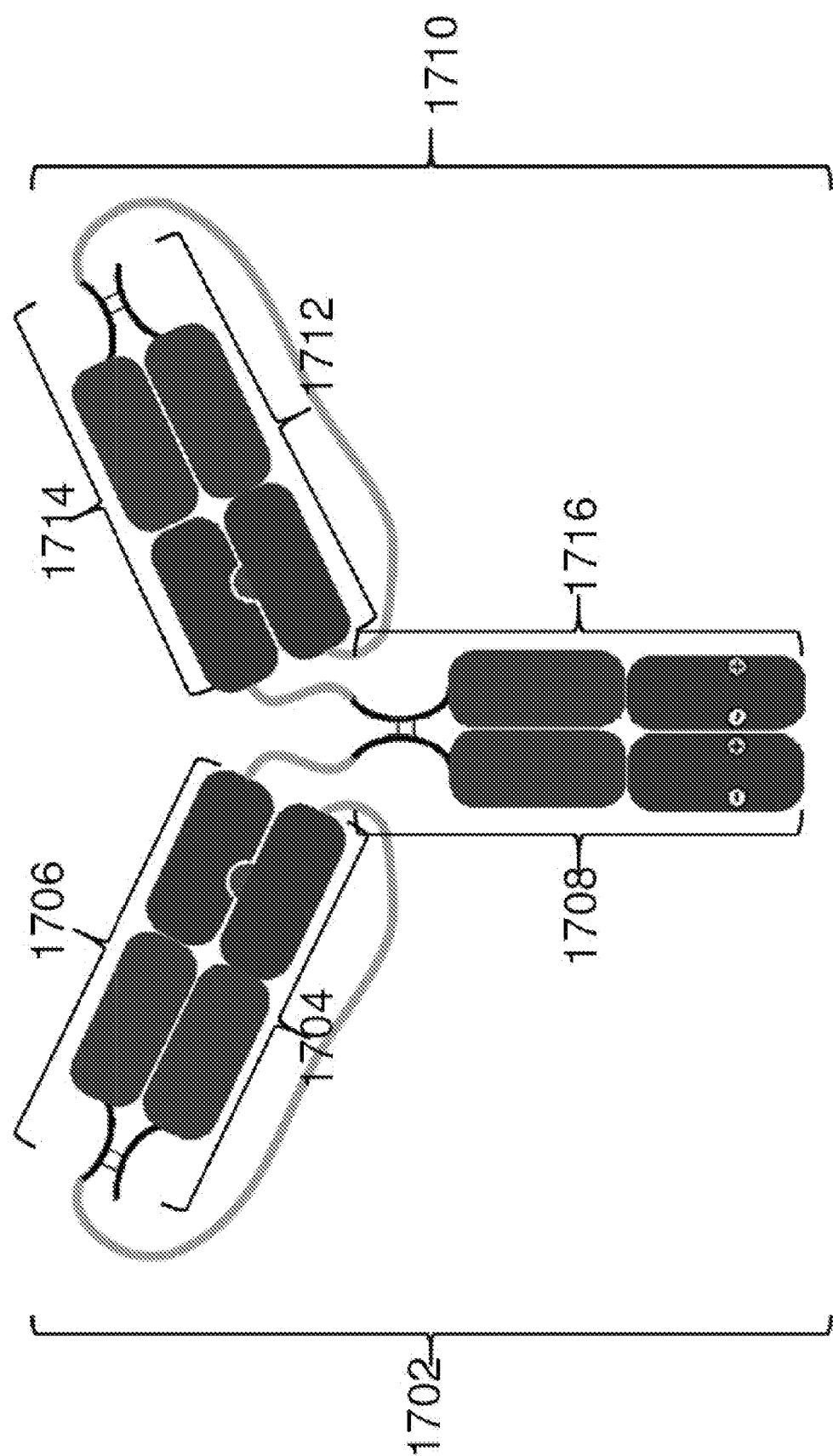


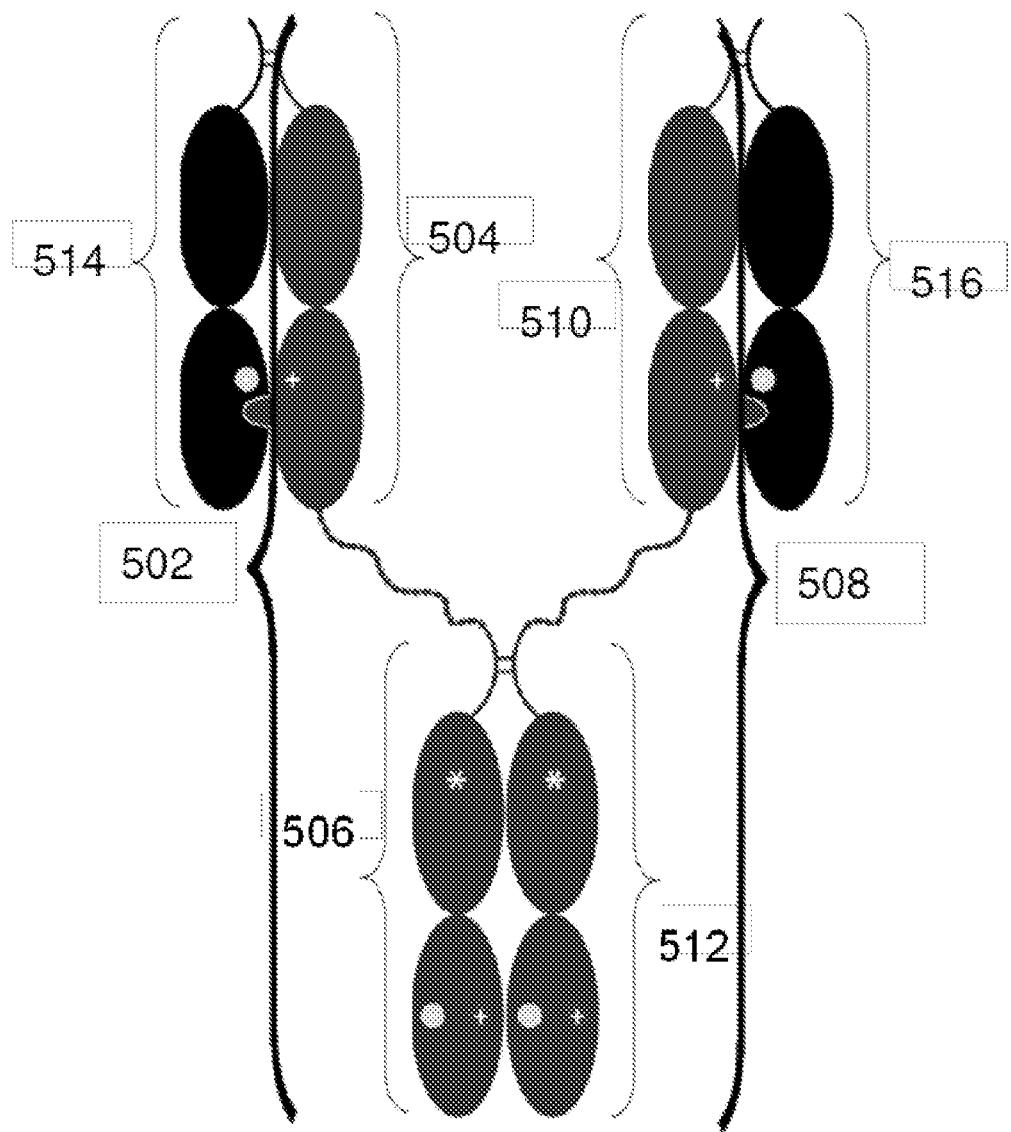
FIG. 18A

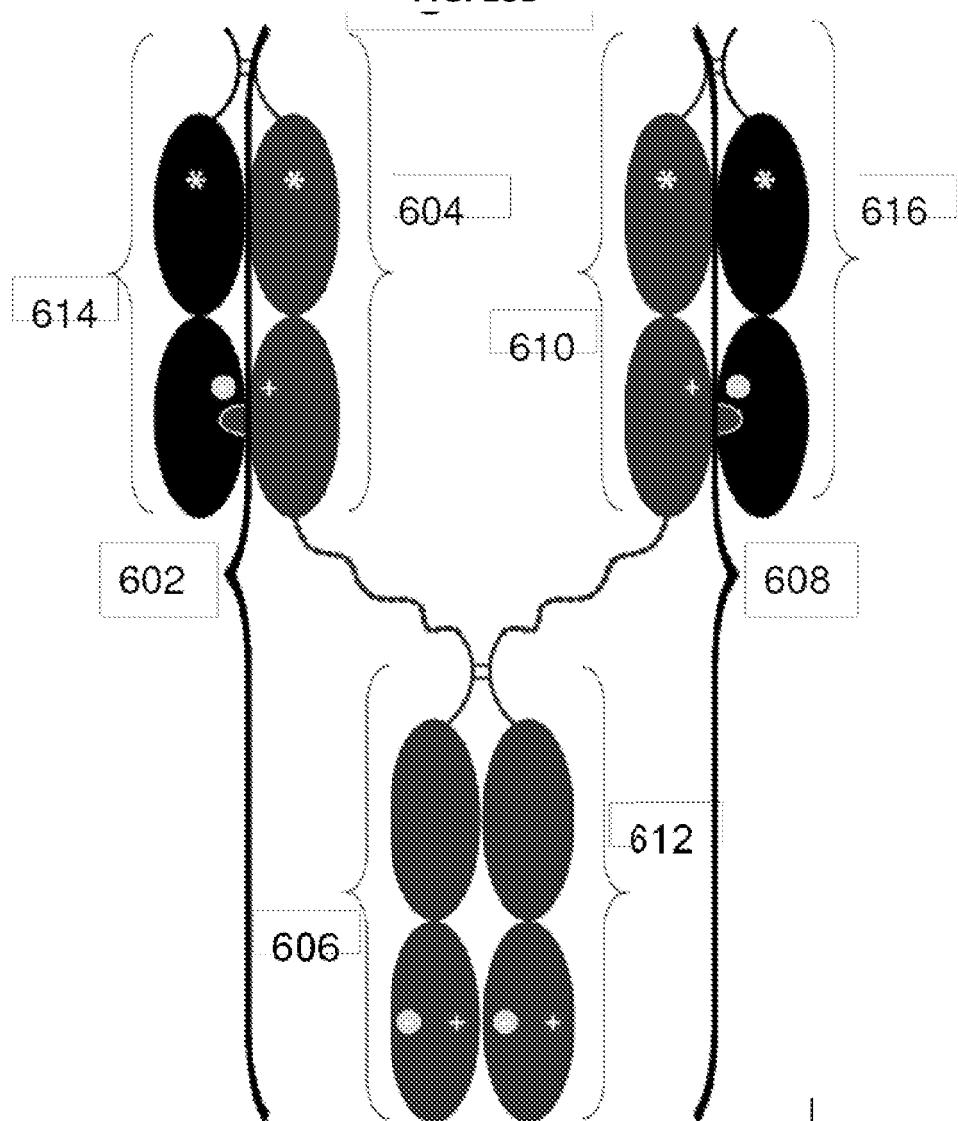
FIG. 18B

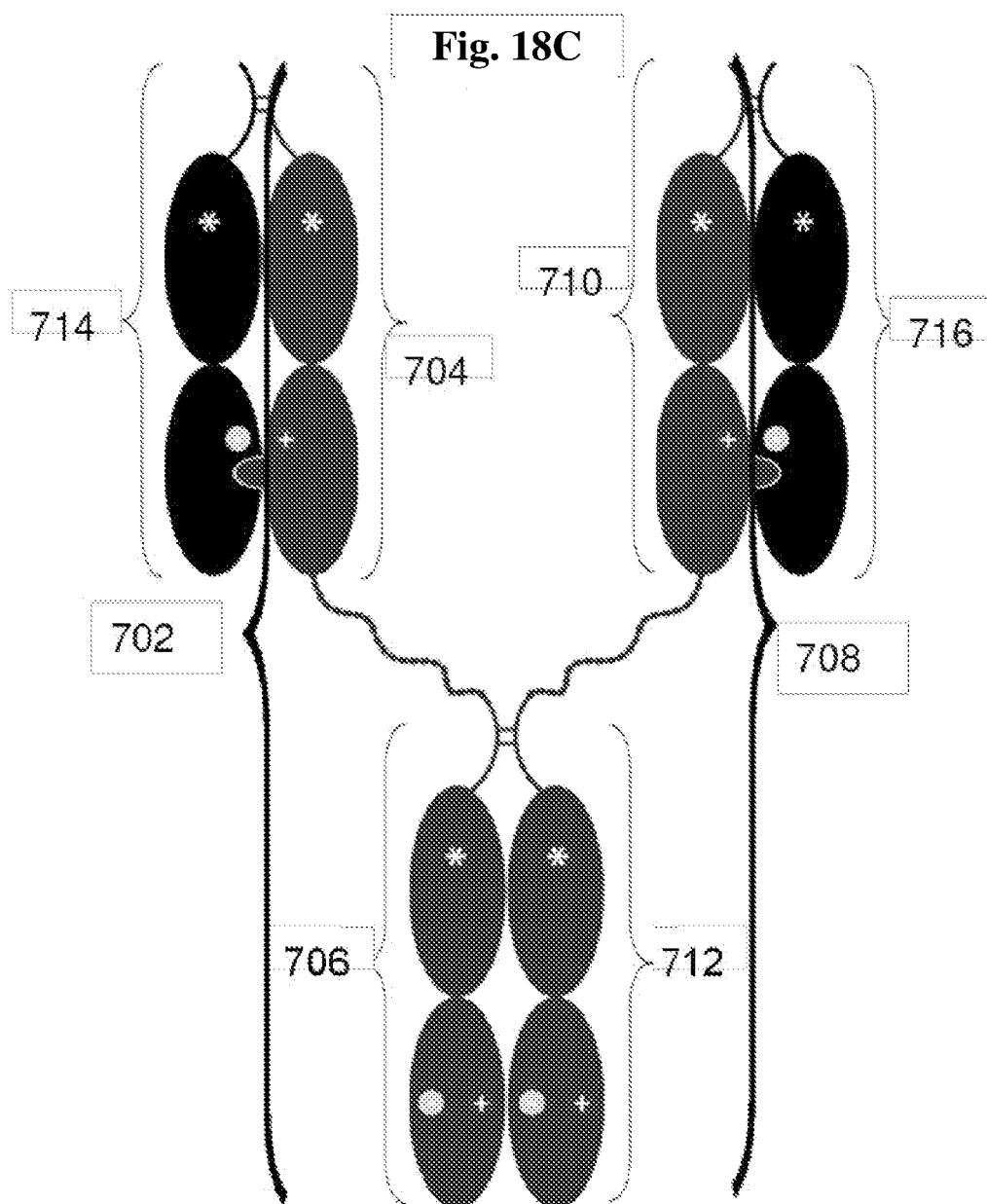
Fig. 18C

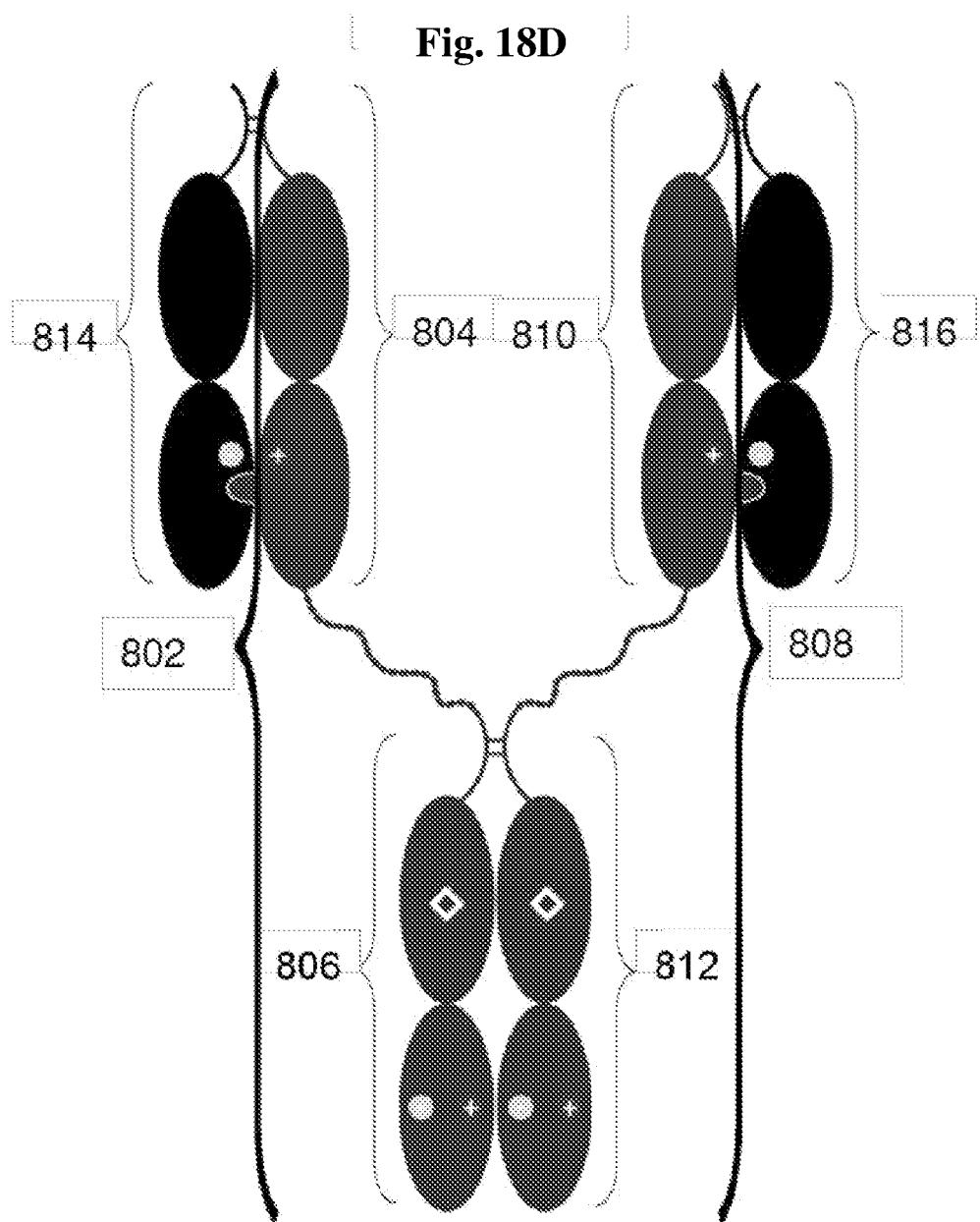
Fig. 18D

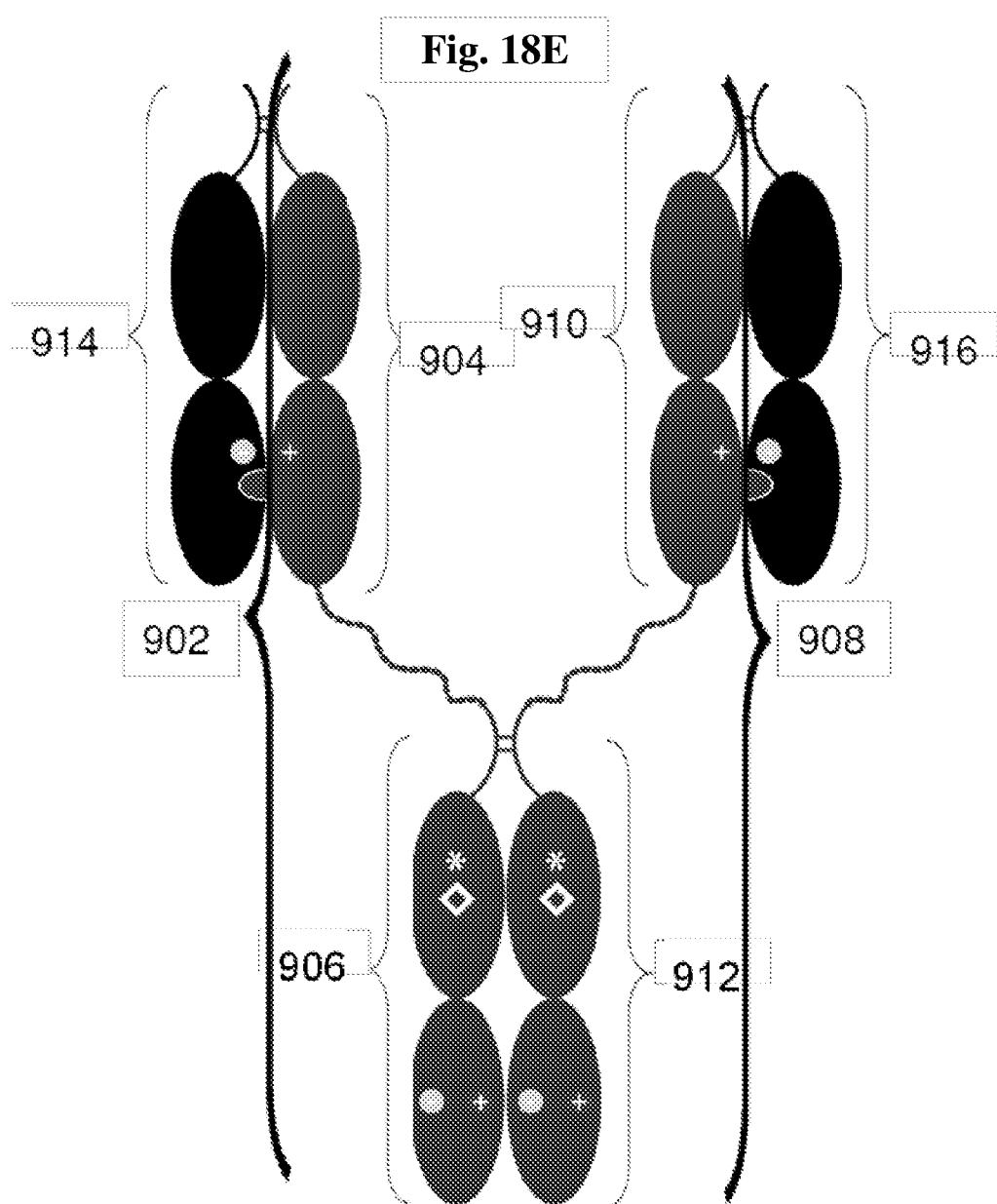
Fig. 18E

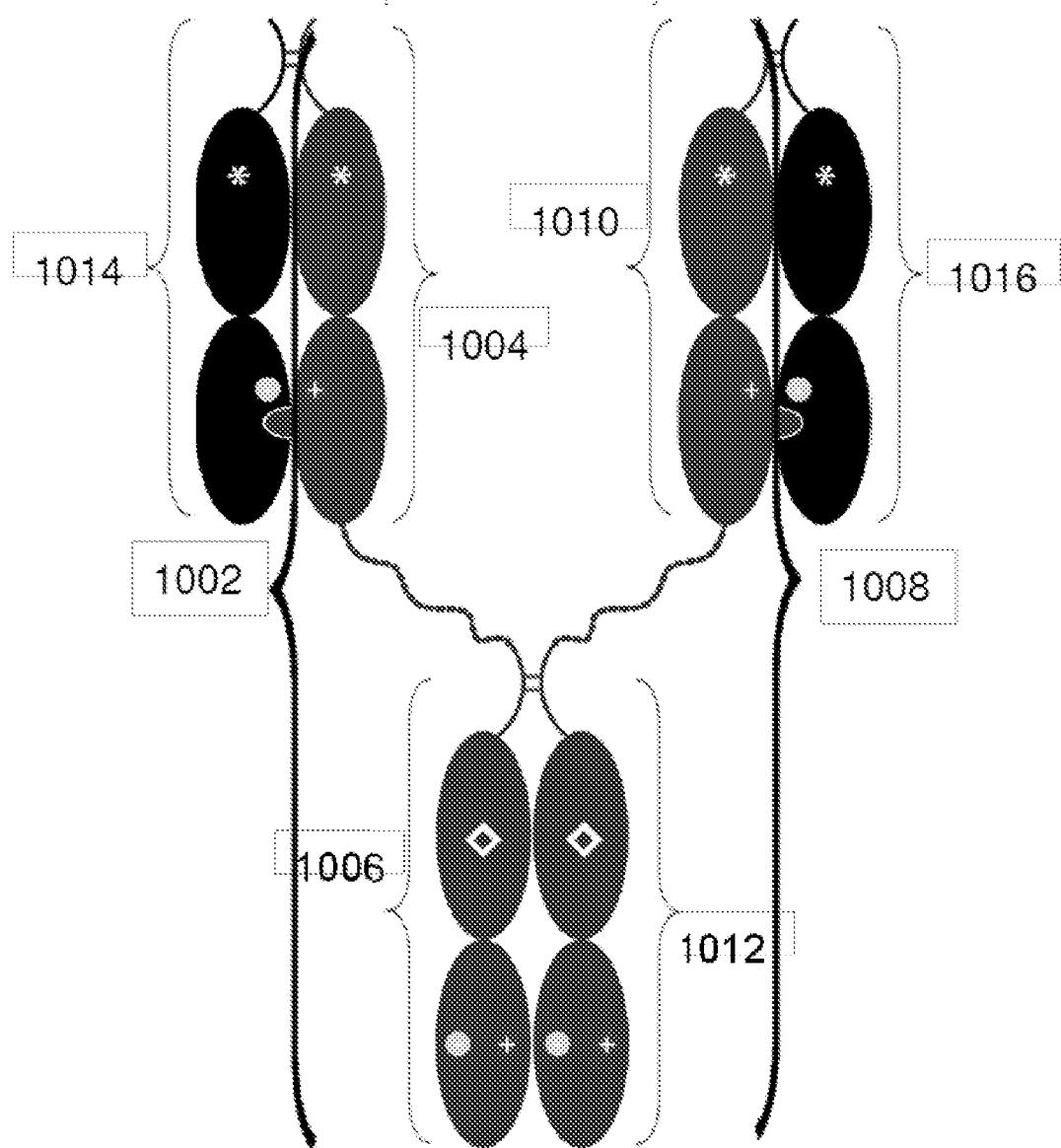
Fig. 18F

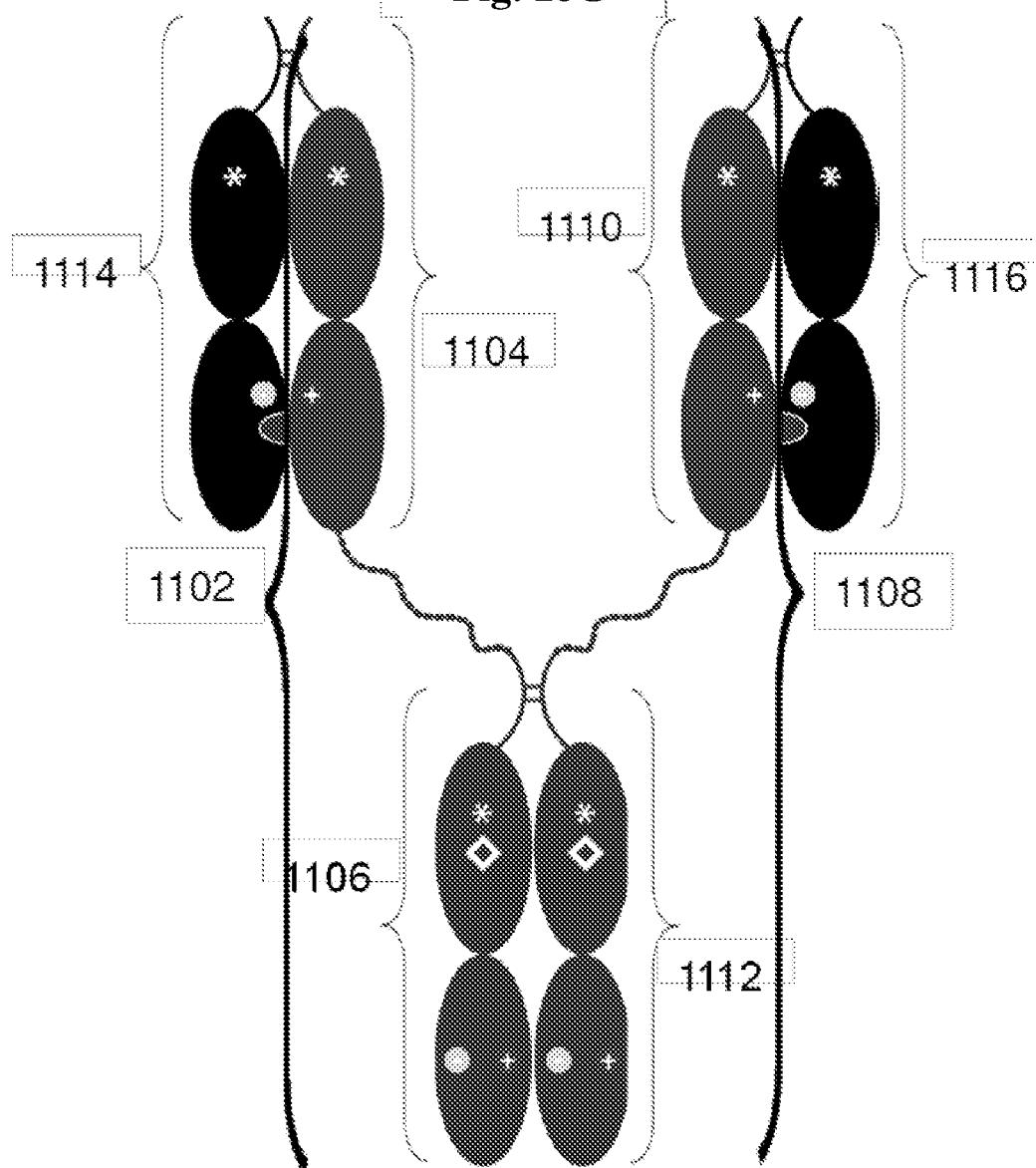
Fig. 18G

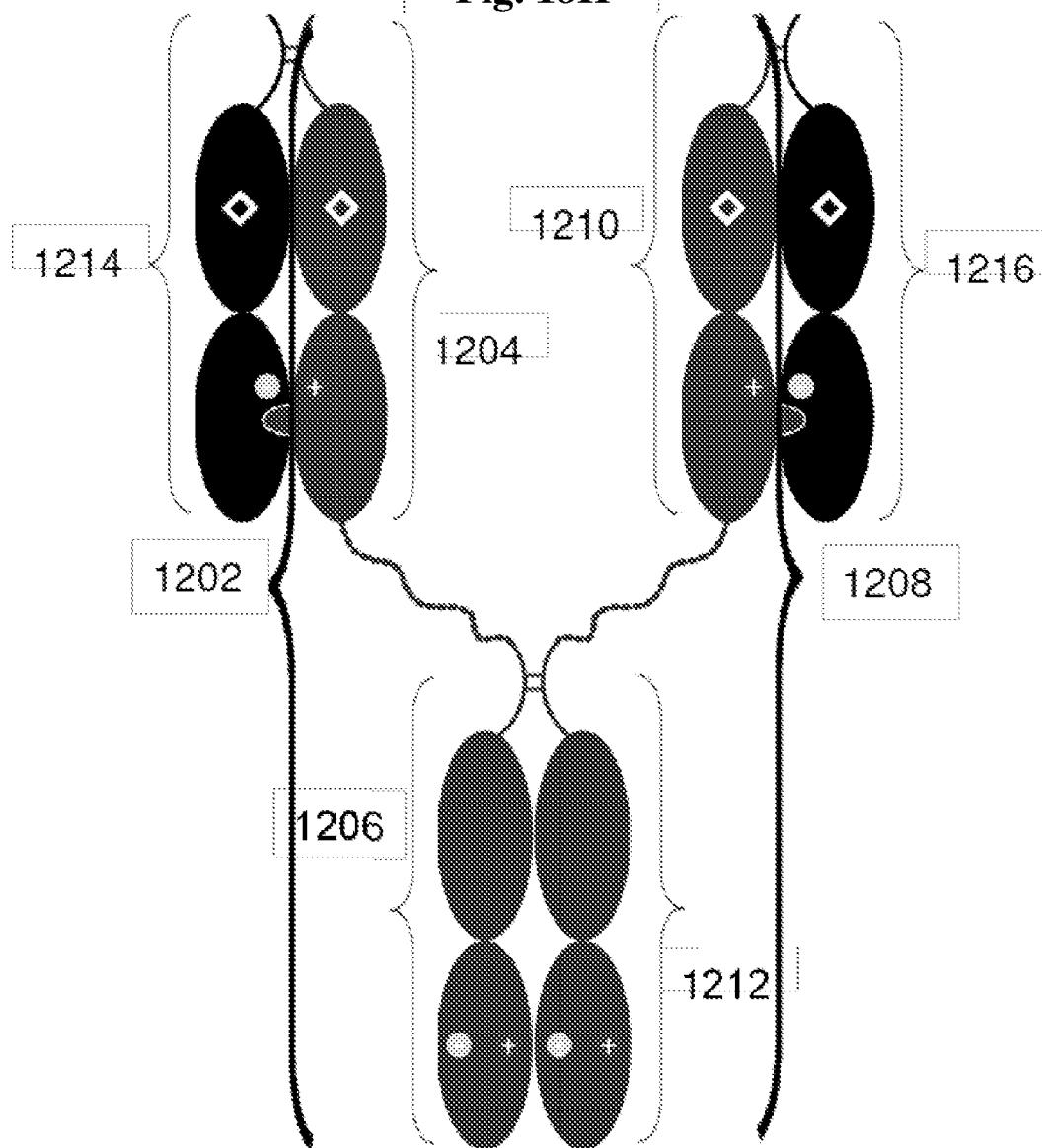
Fig. 18H

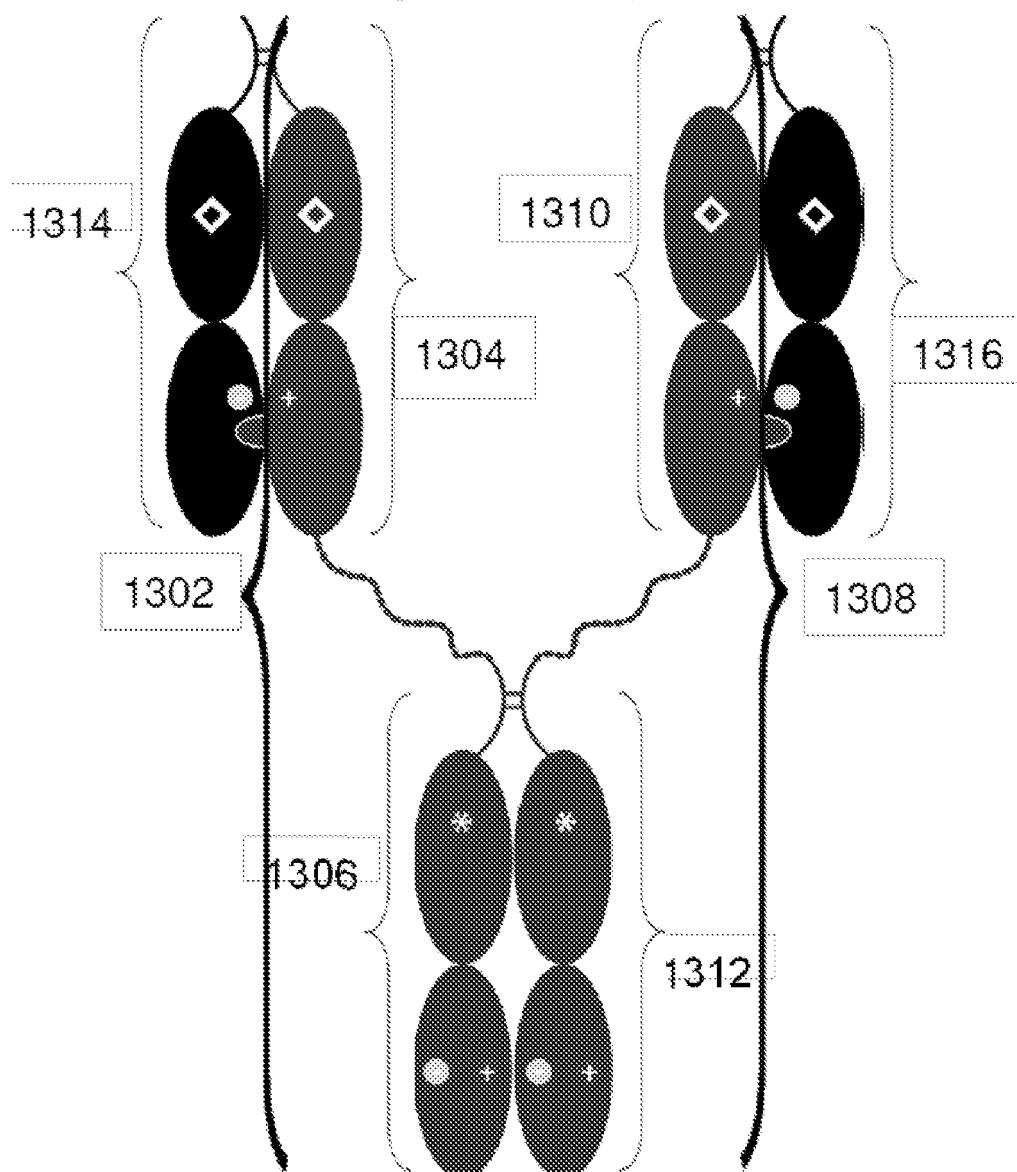
Fig. 18I

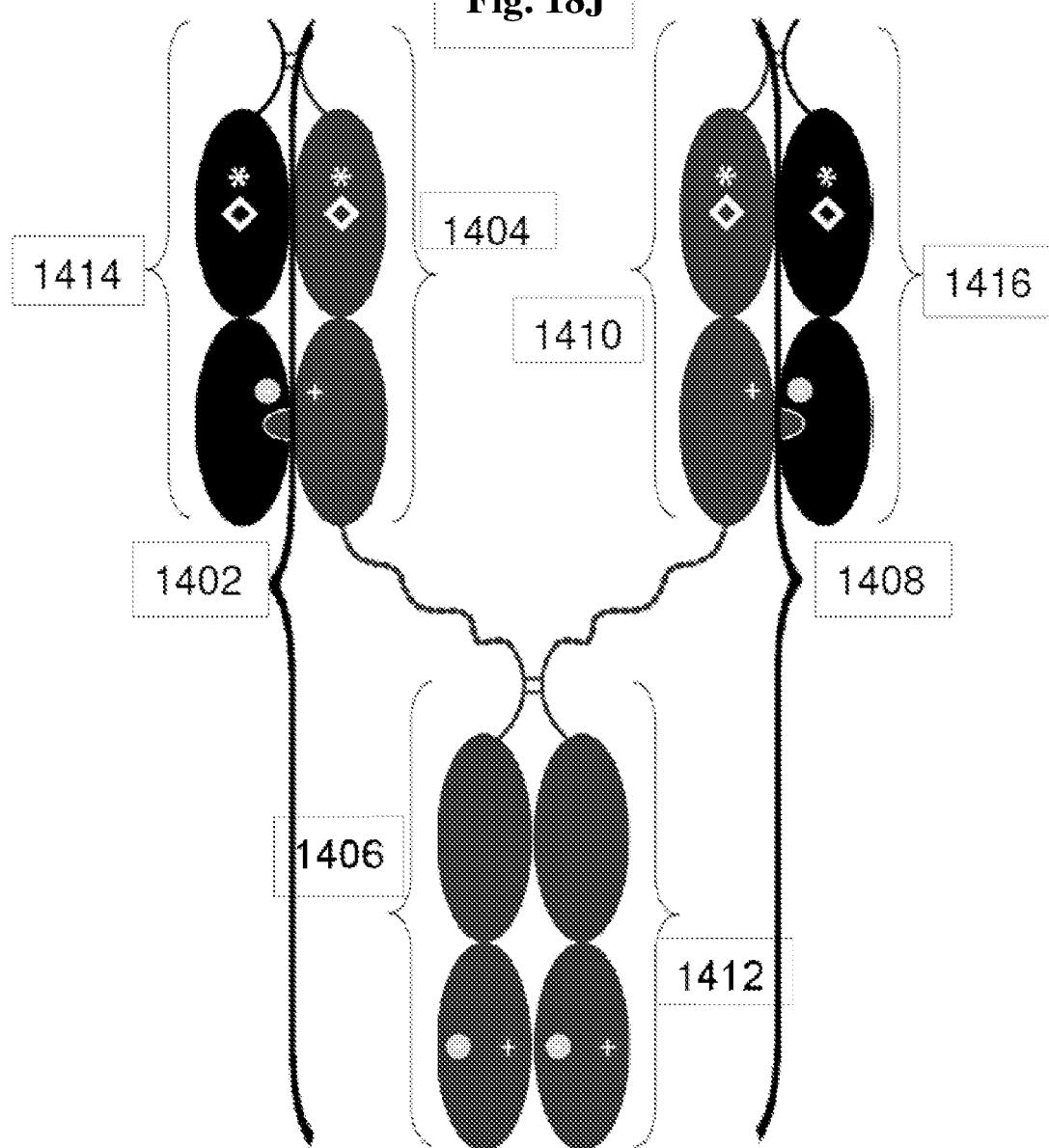
Fig. 18J

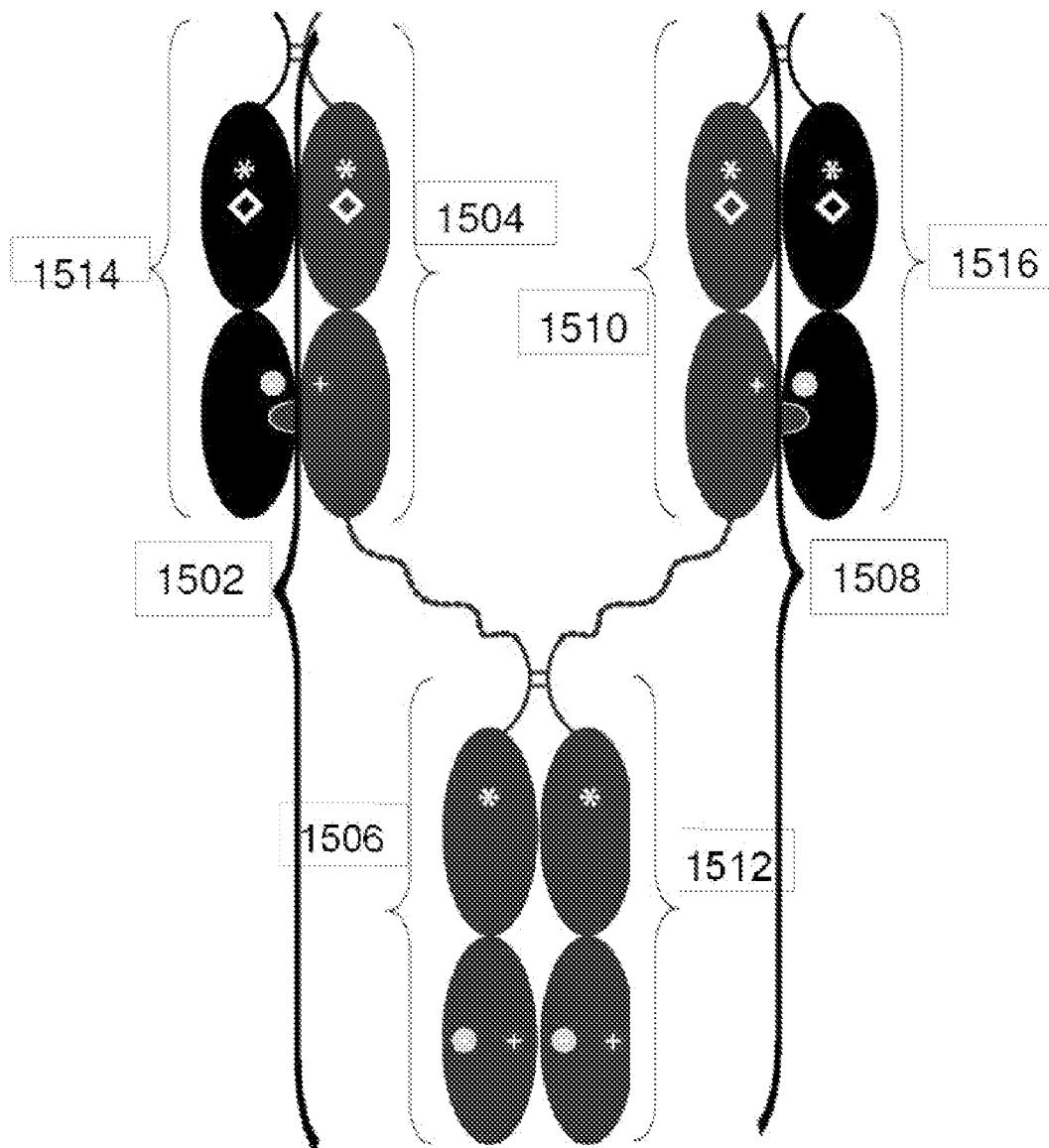
Fig. 18K

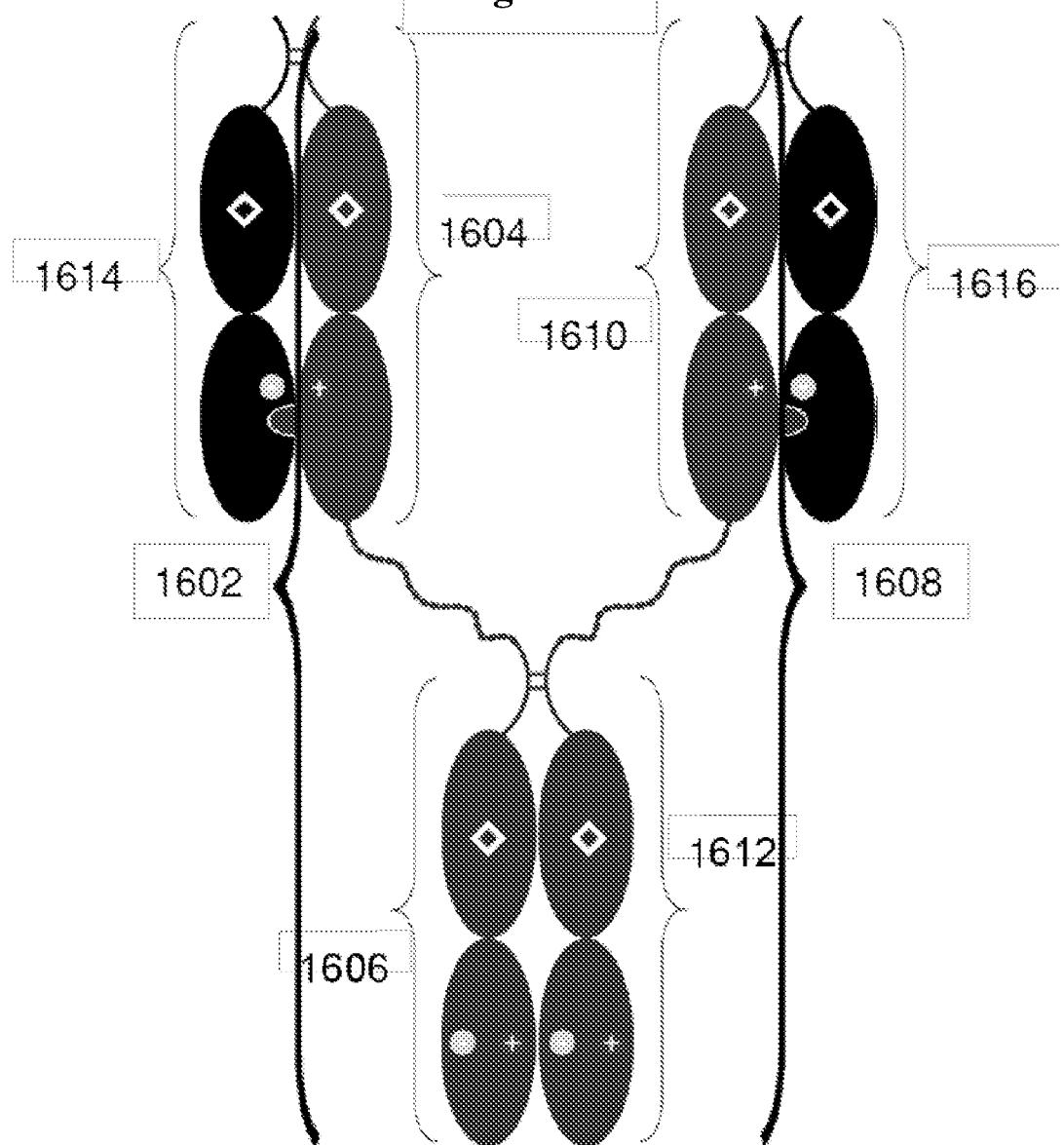
Fig. 18L

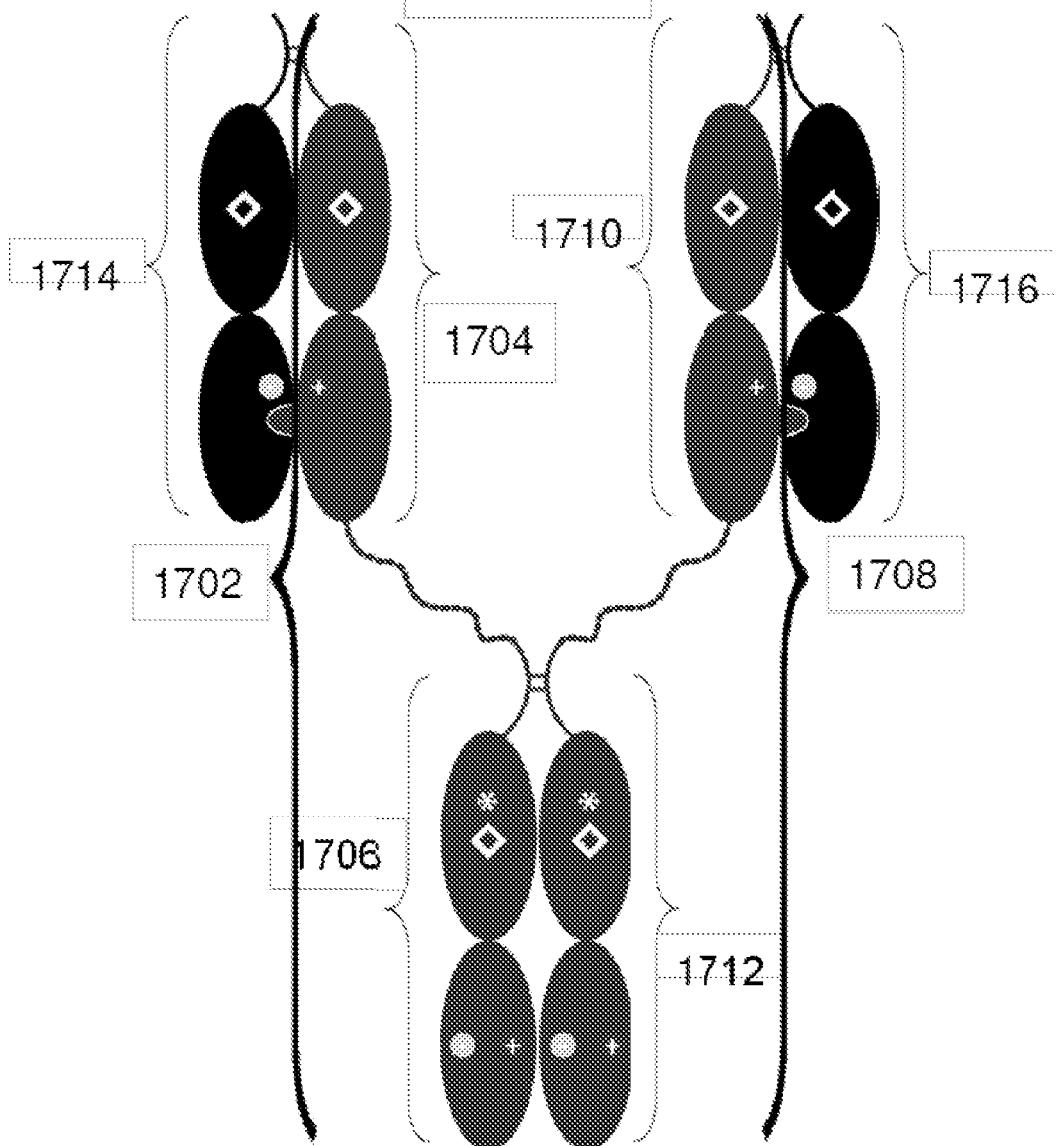
Fig. 18M

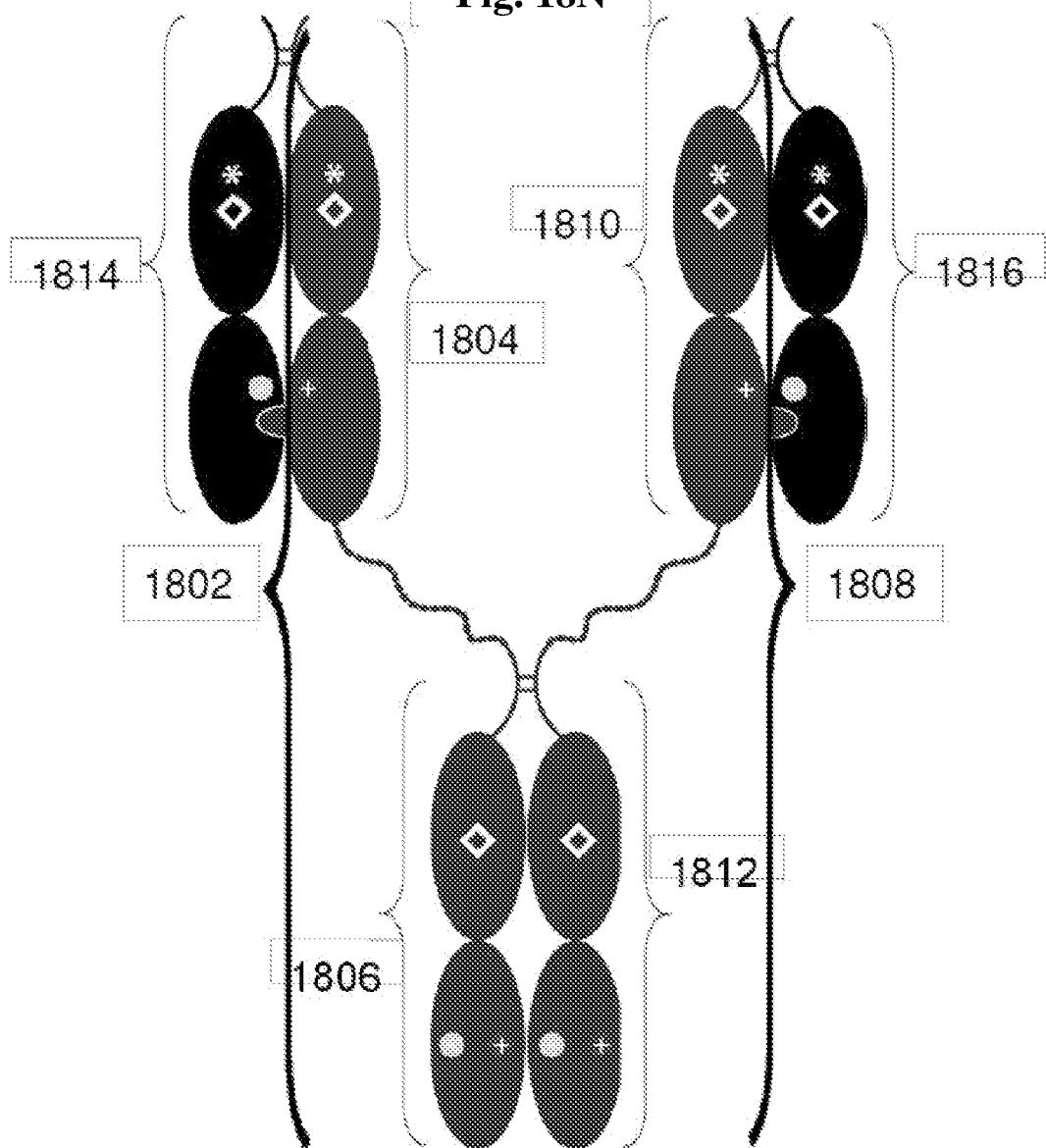
Fig. 18N

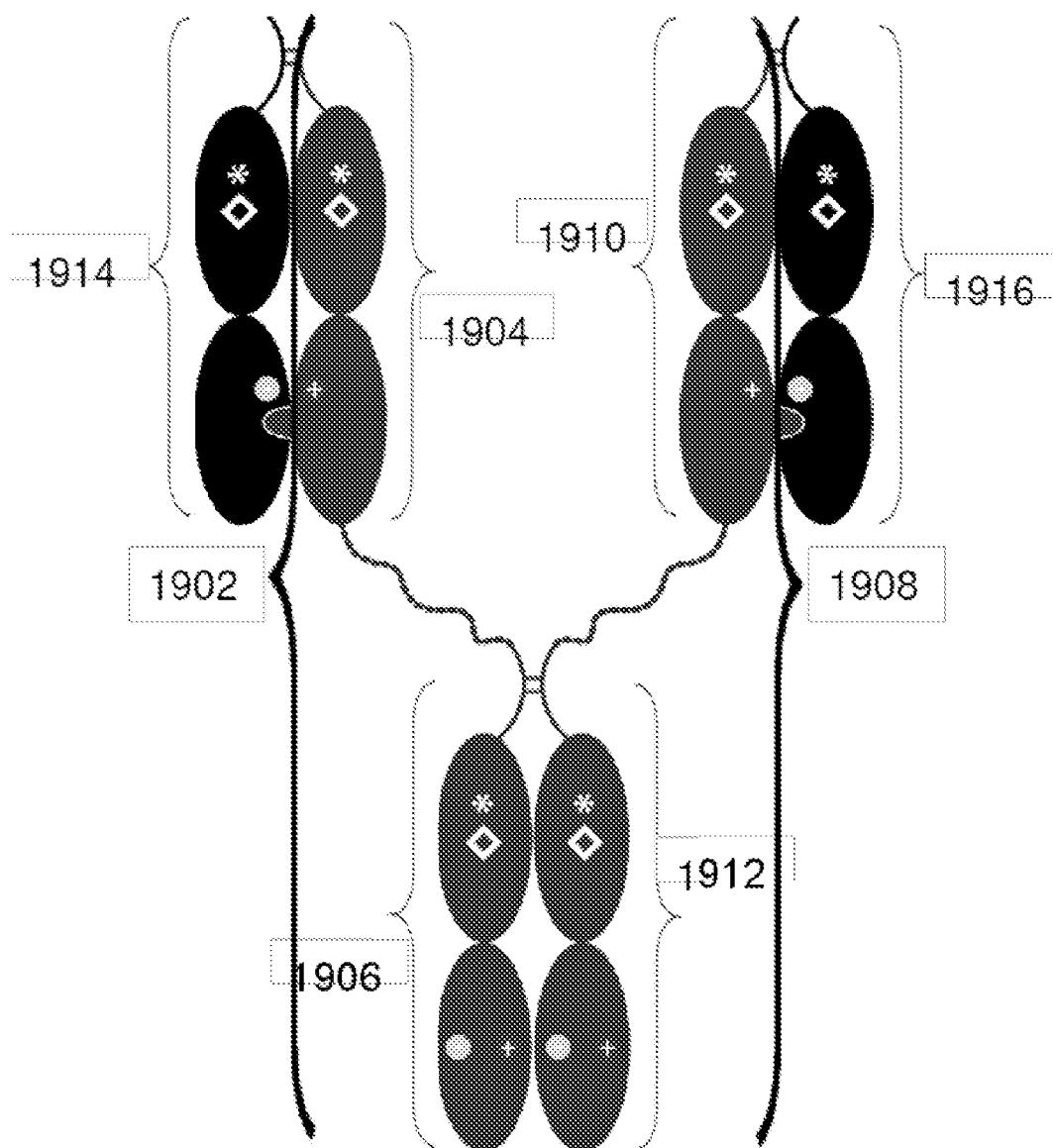
Fig. 18O

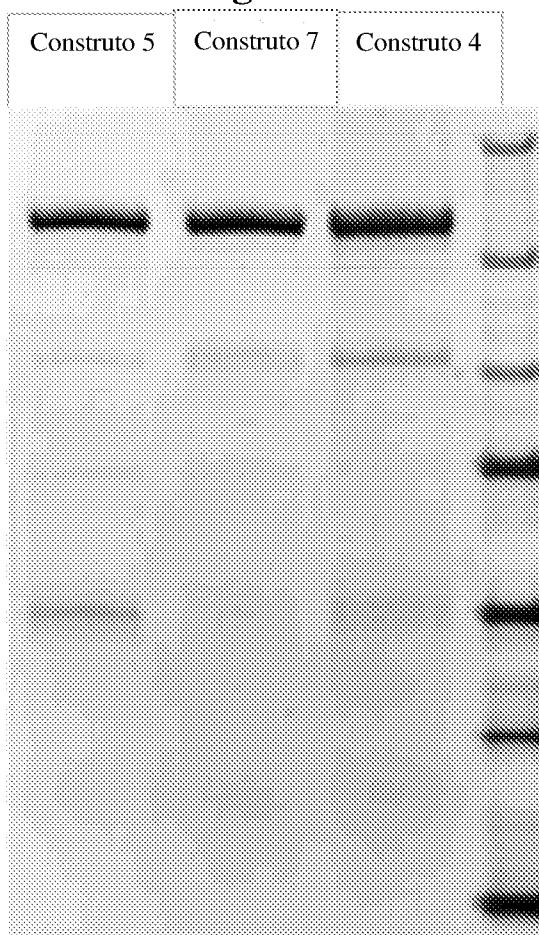
Fig. 18P

FIG. 19

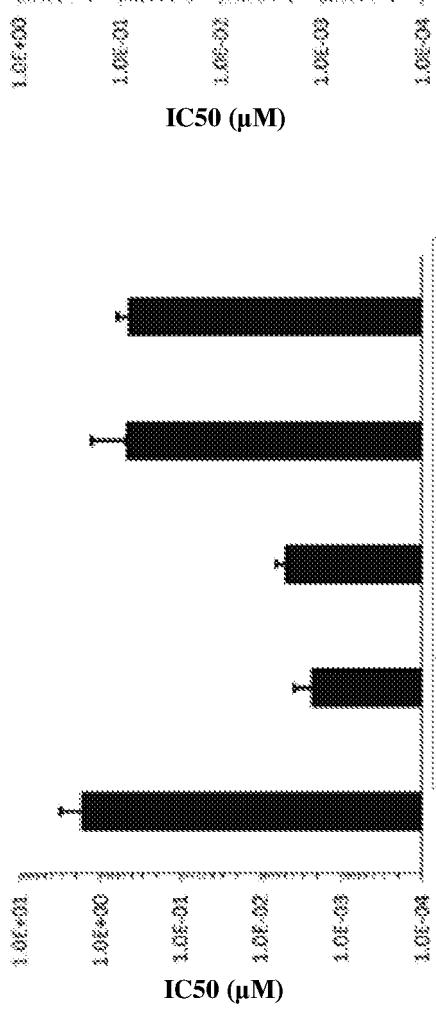
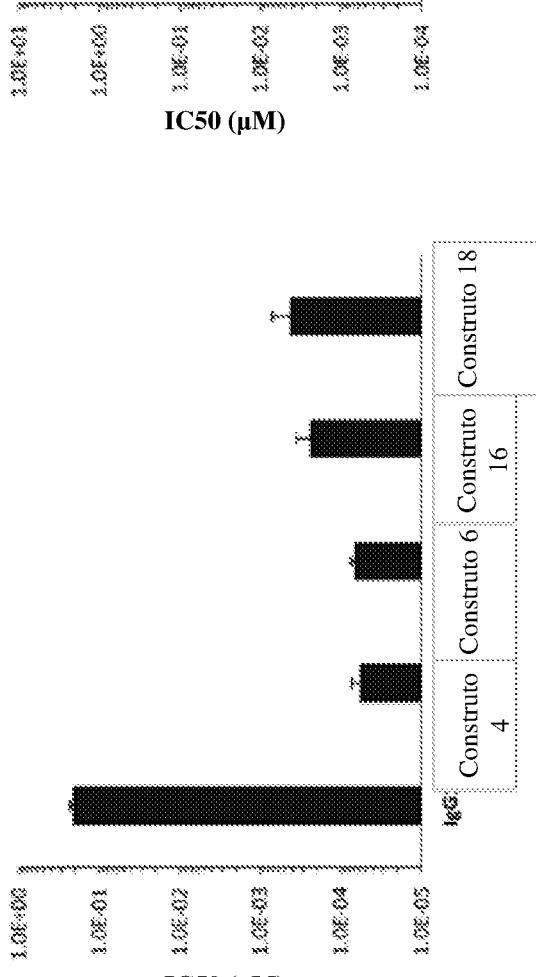


FIG. 19C



Construct	IC50 (μM)
IgG1	~1.0E-04
Construto 4	~1.0E-04
Construto 6	~1.0E-04
Construto 16	~1.0E-04
Construto 18	~1.0E-04

FIG

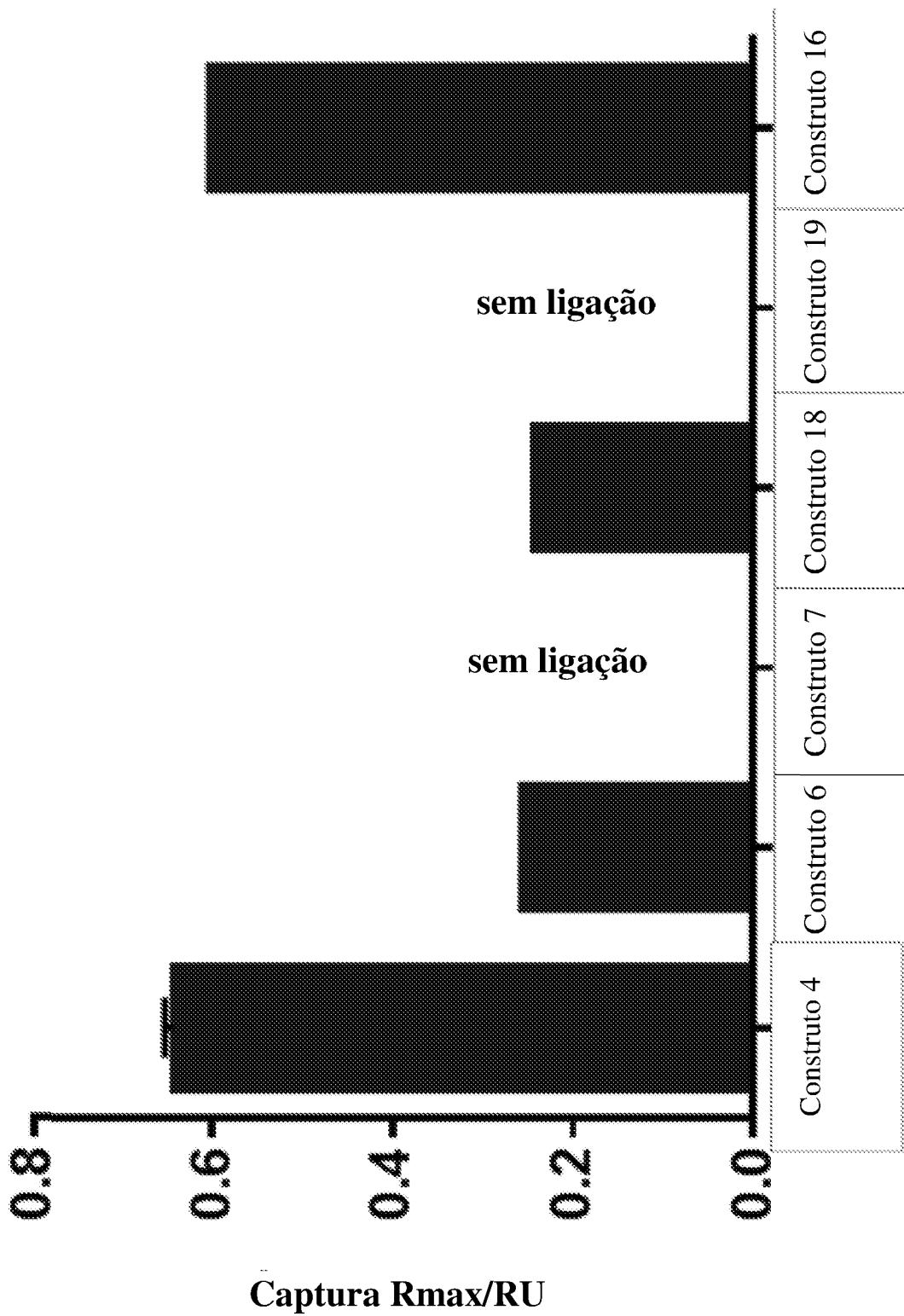
FIG. 20

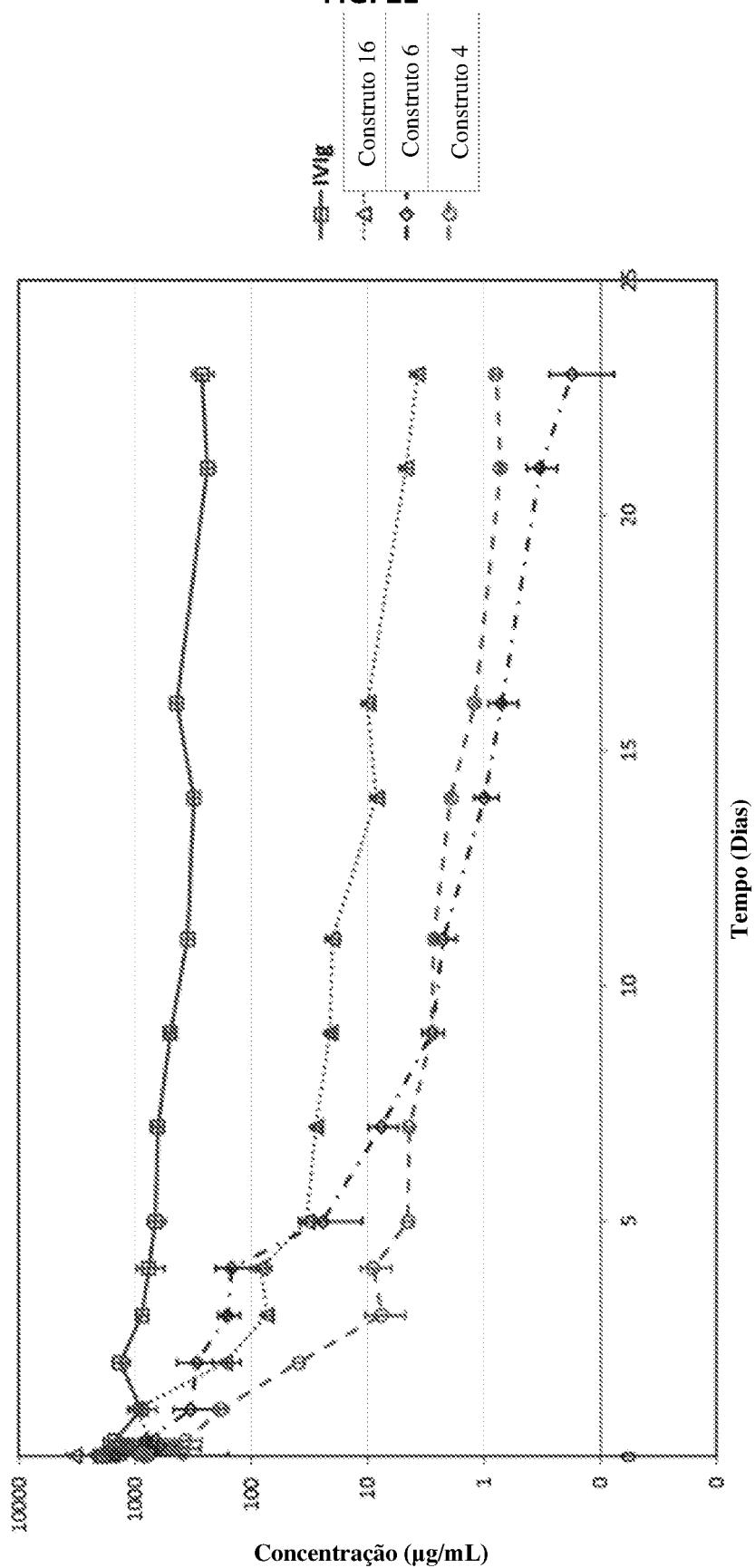
FIG. 21

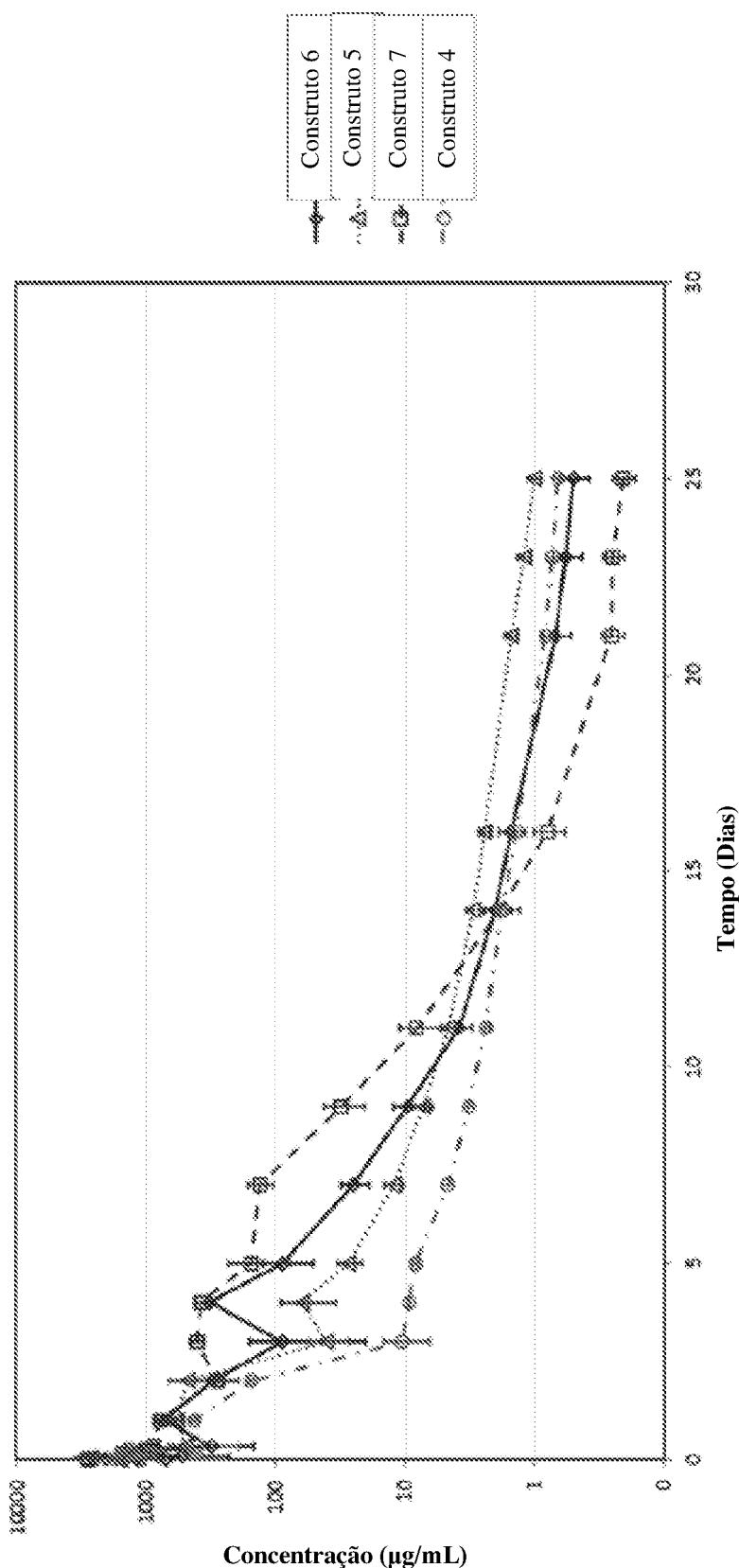
FIG. 22

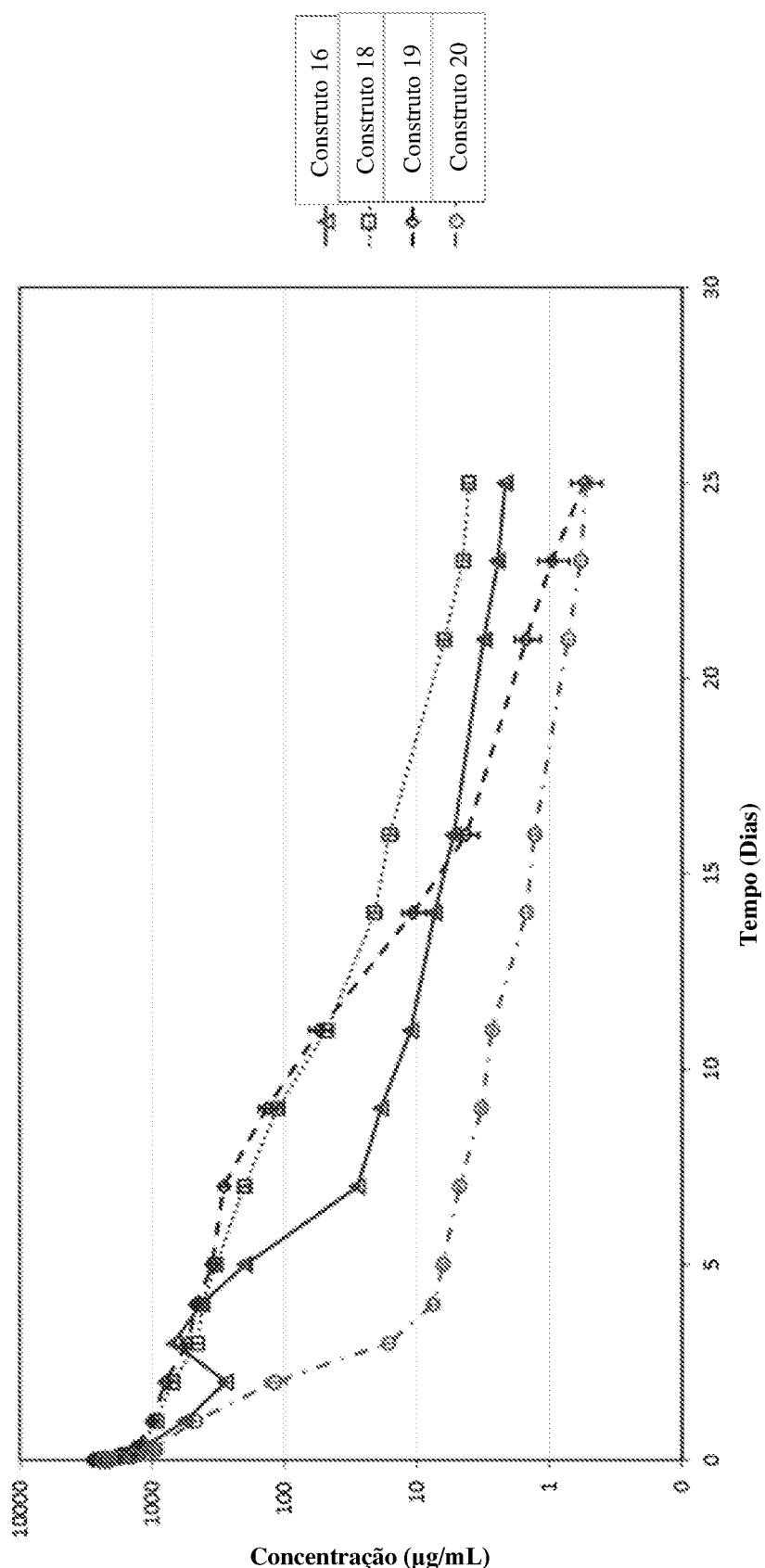
FIG. 23

FIG. 24

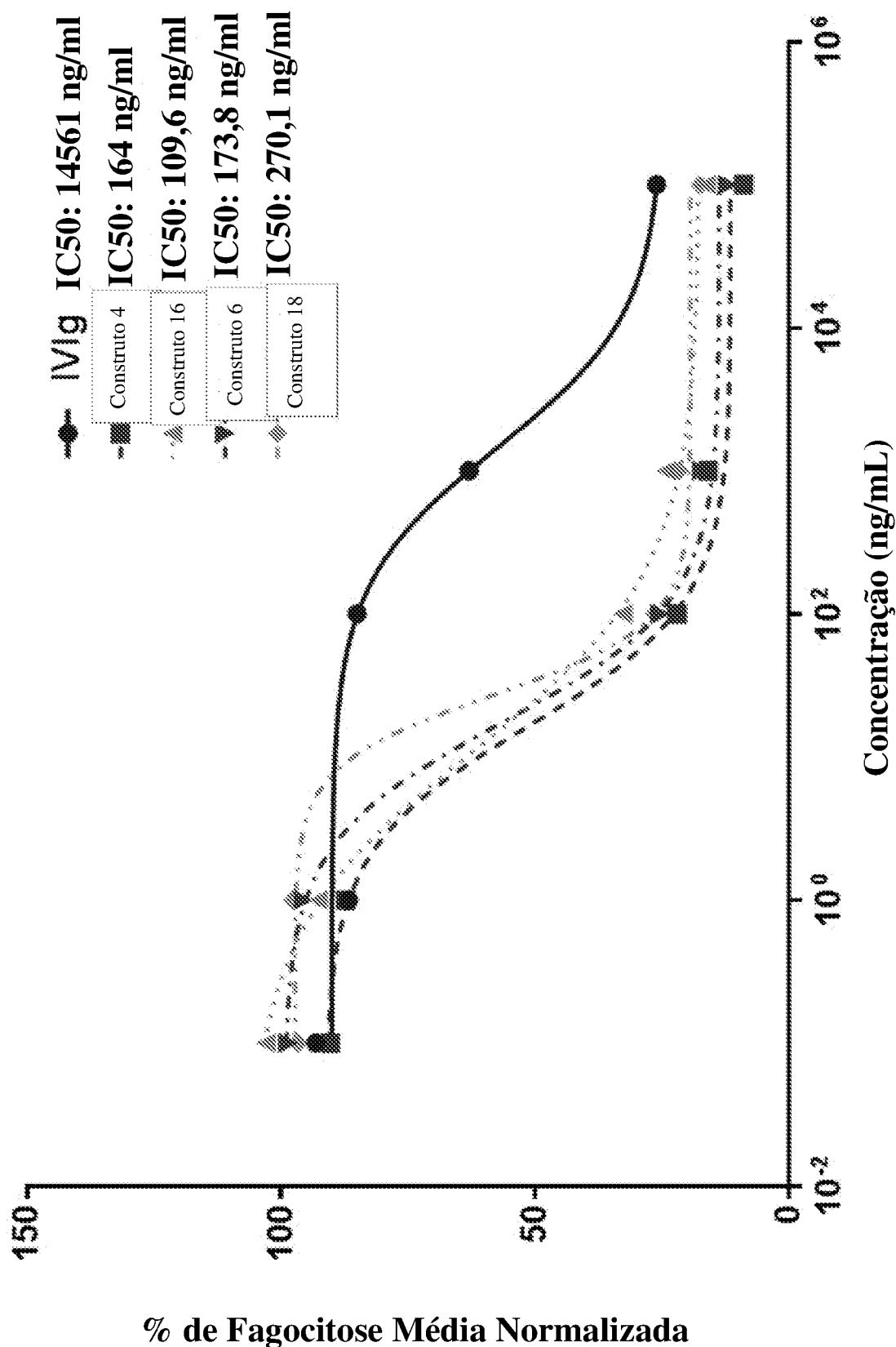


FIG. 25

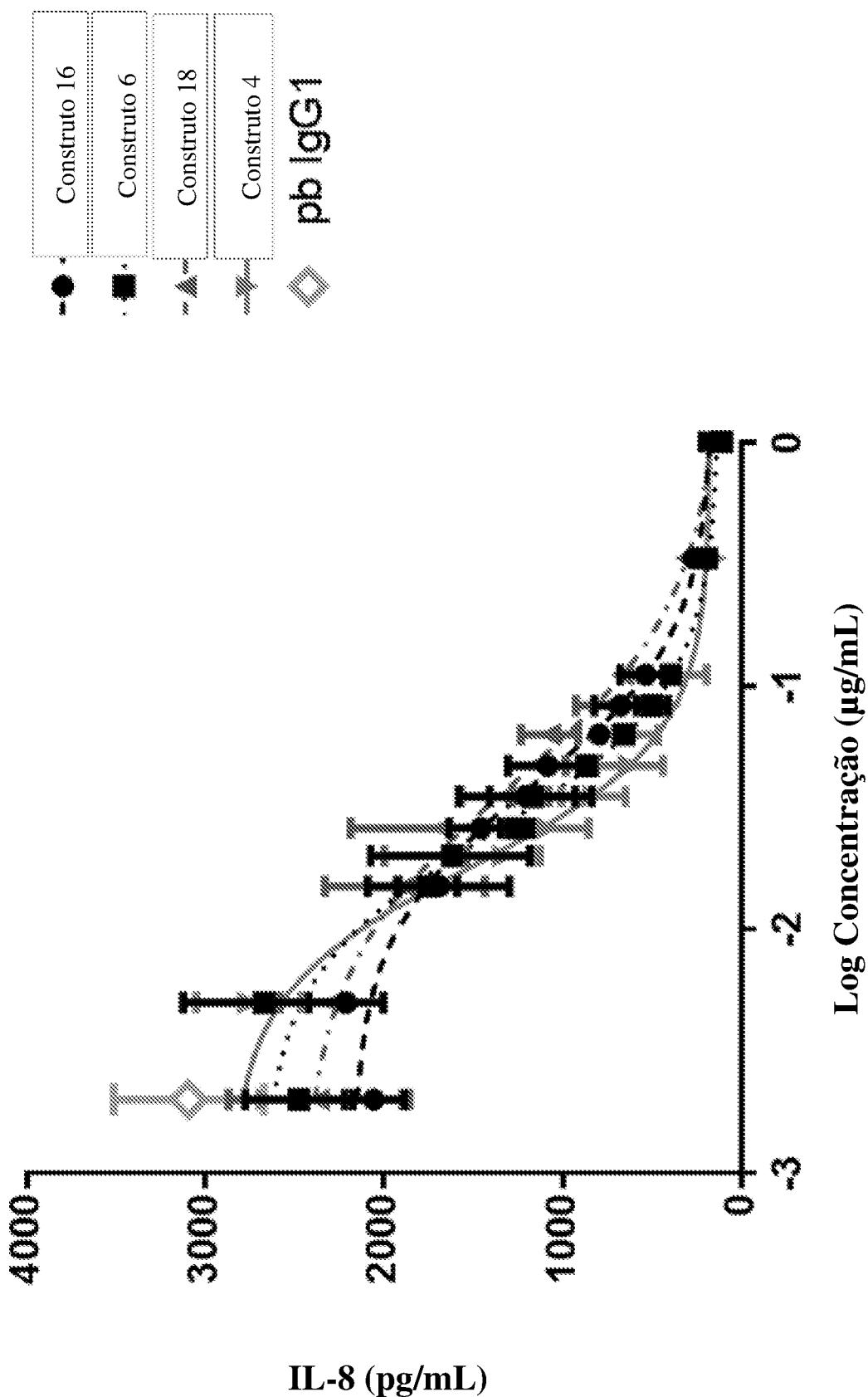


FIG. 26

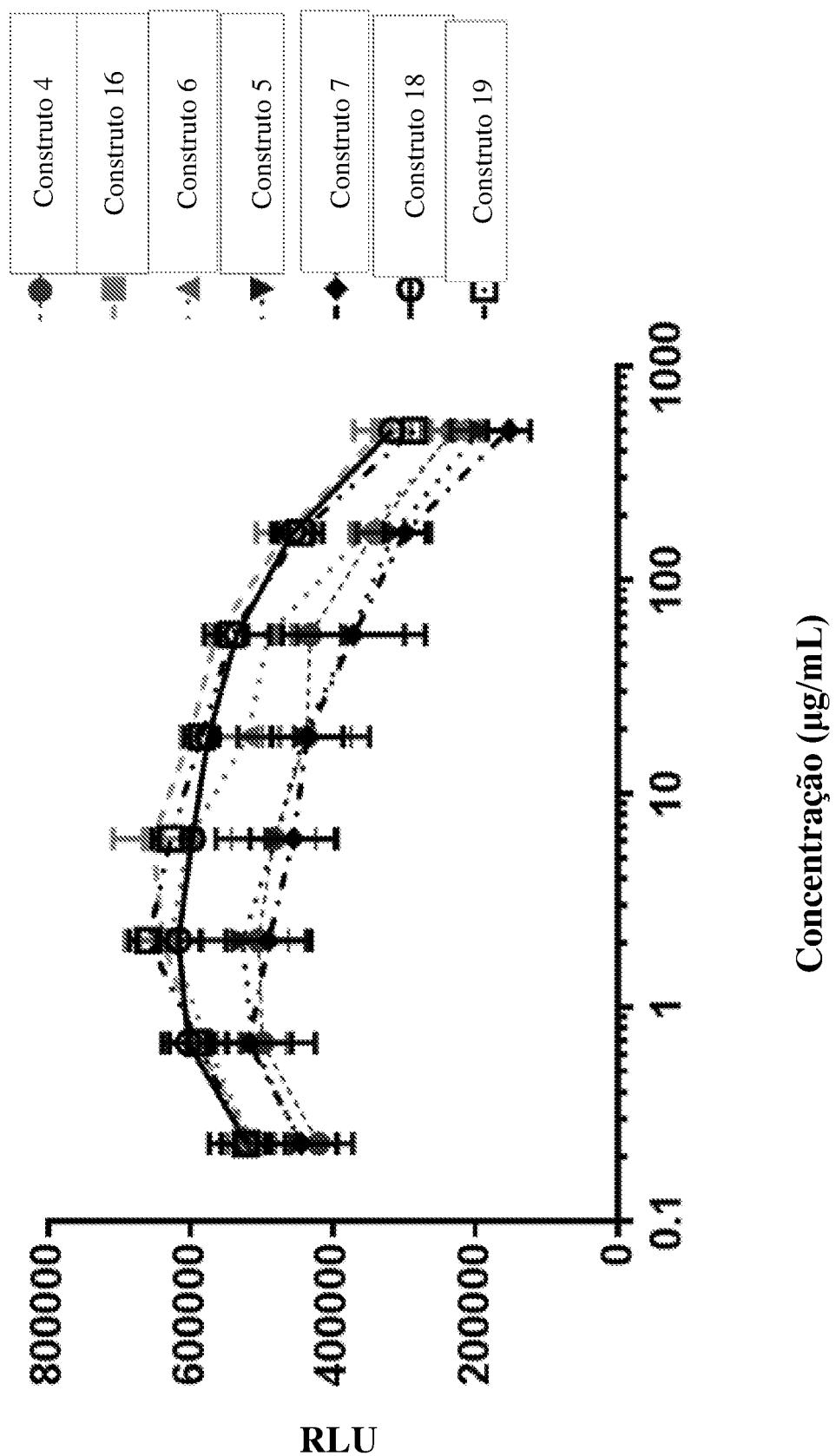


FIG. 27

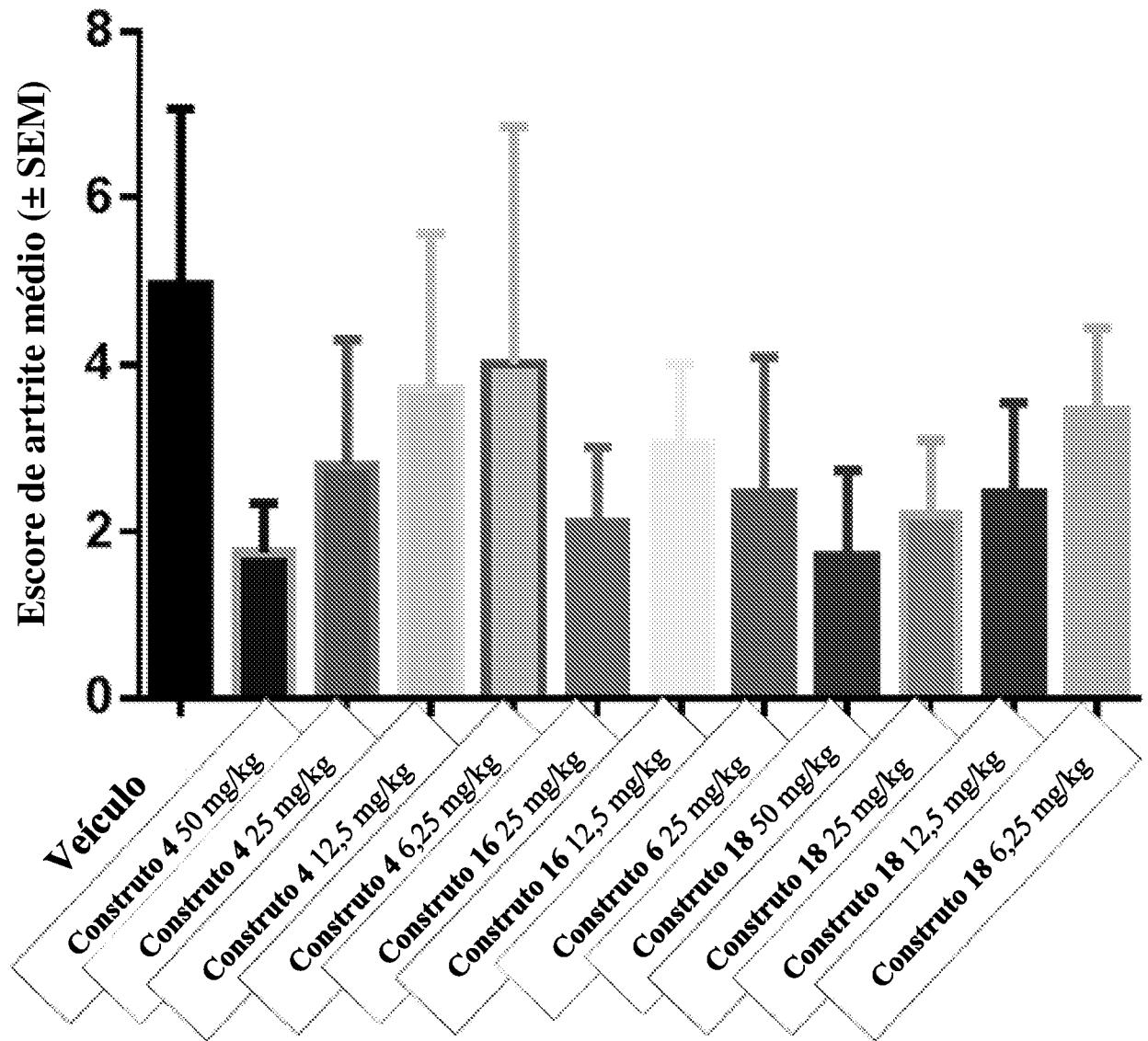


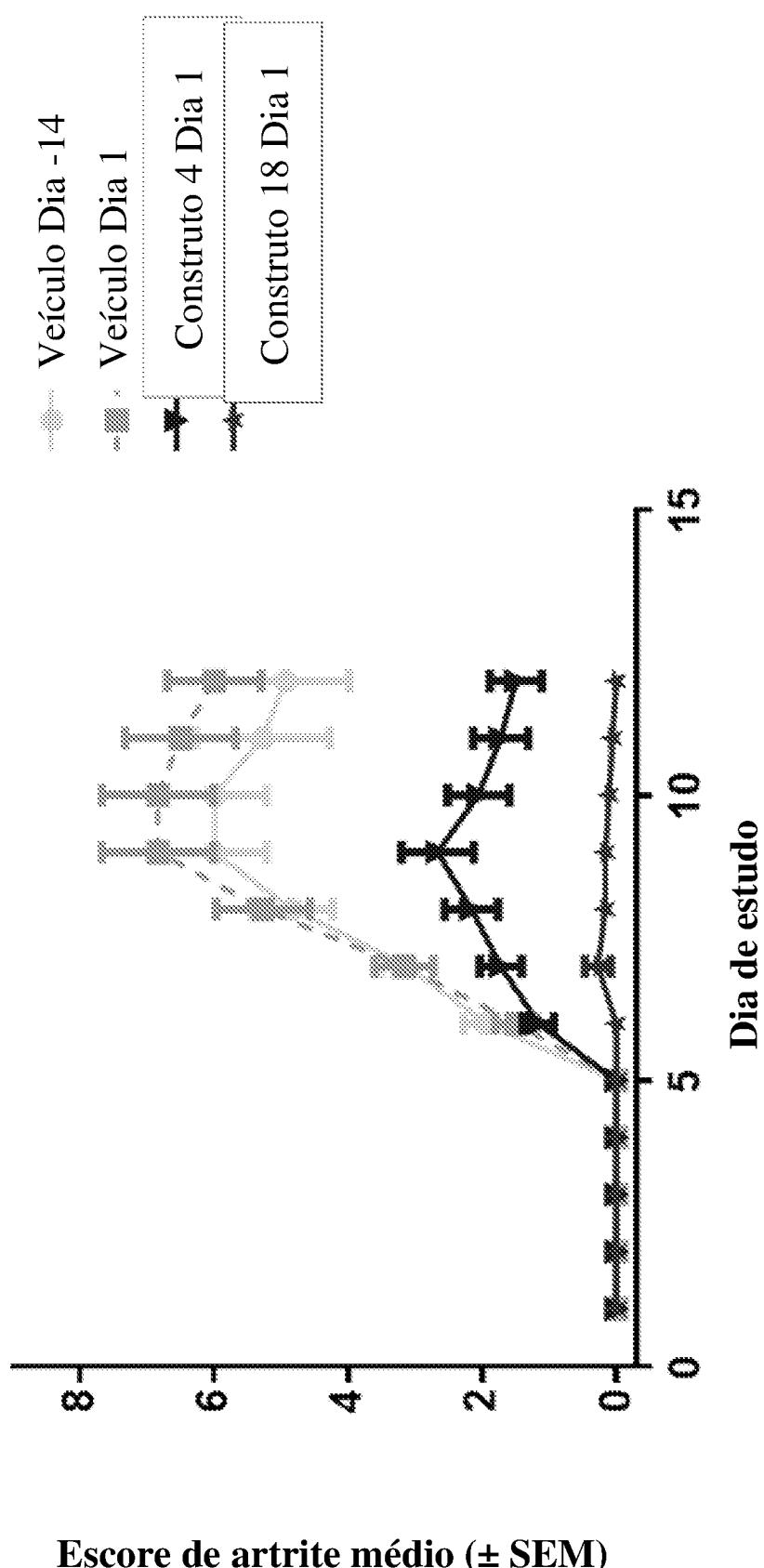
FIG. 28**Escore de artrite médio (\pm SEM)**

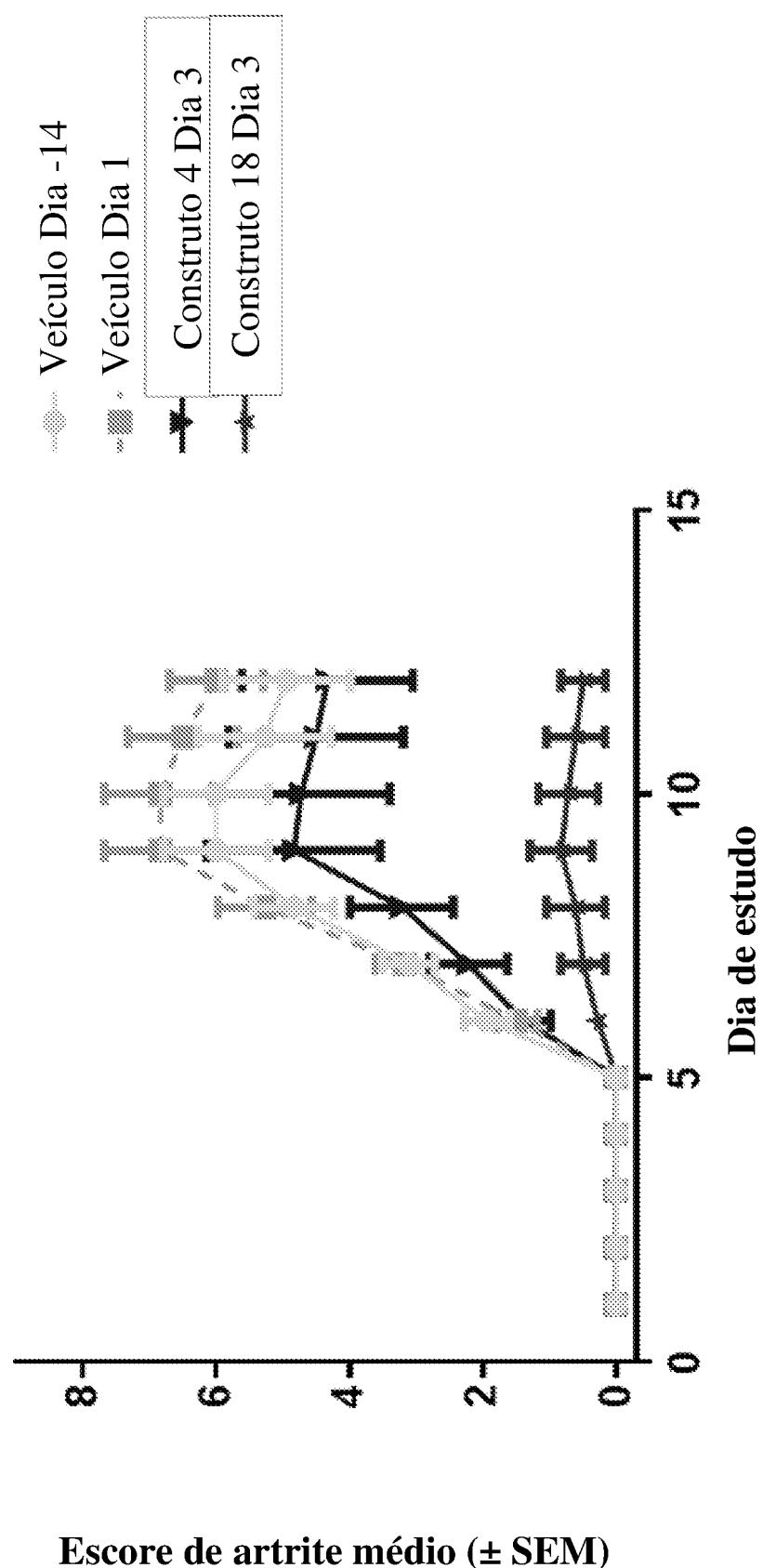
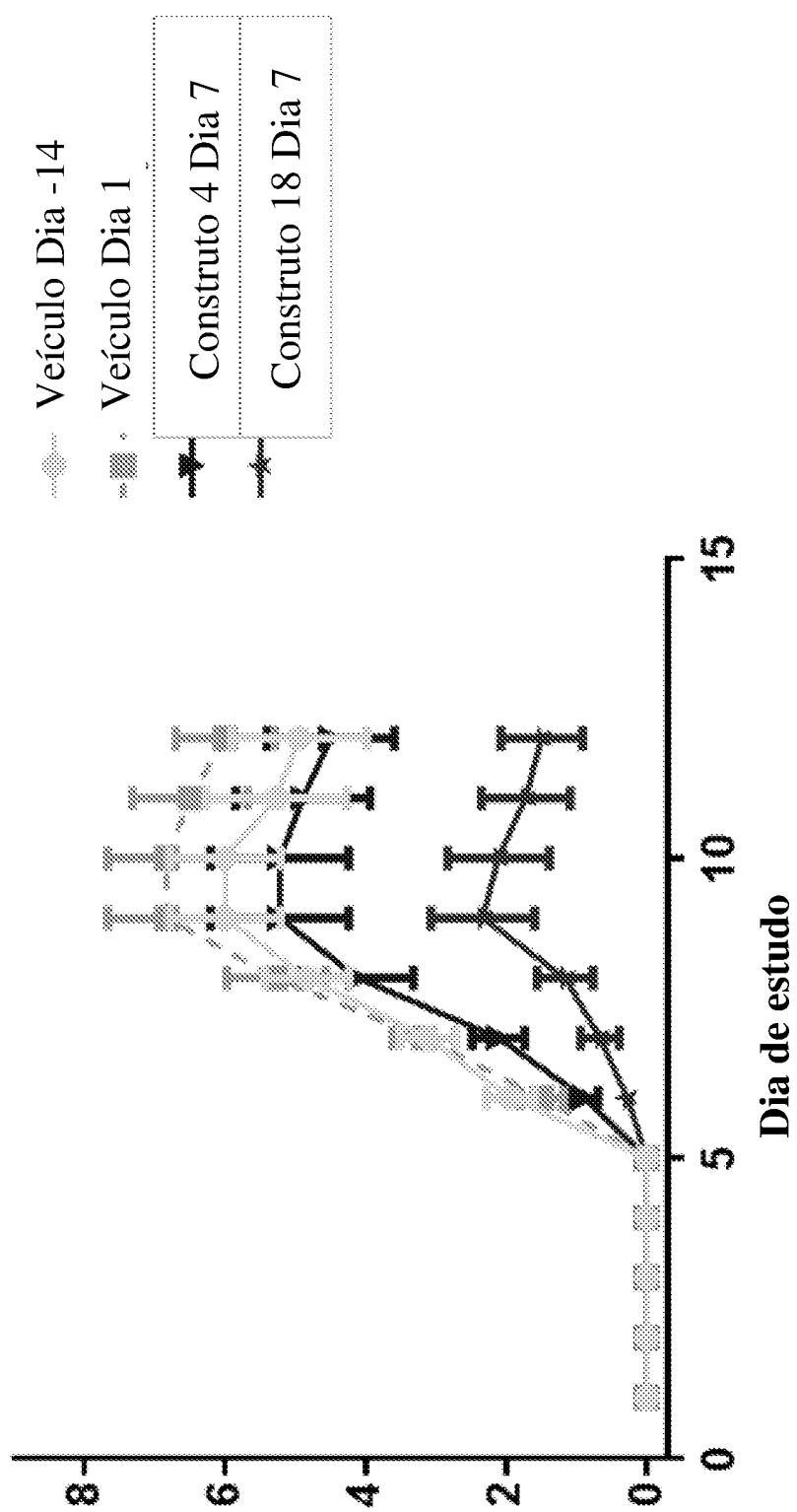
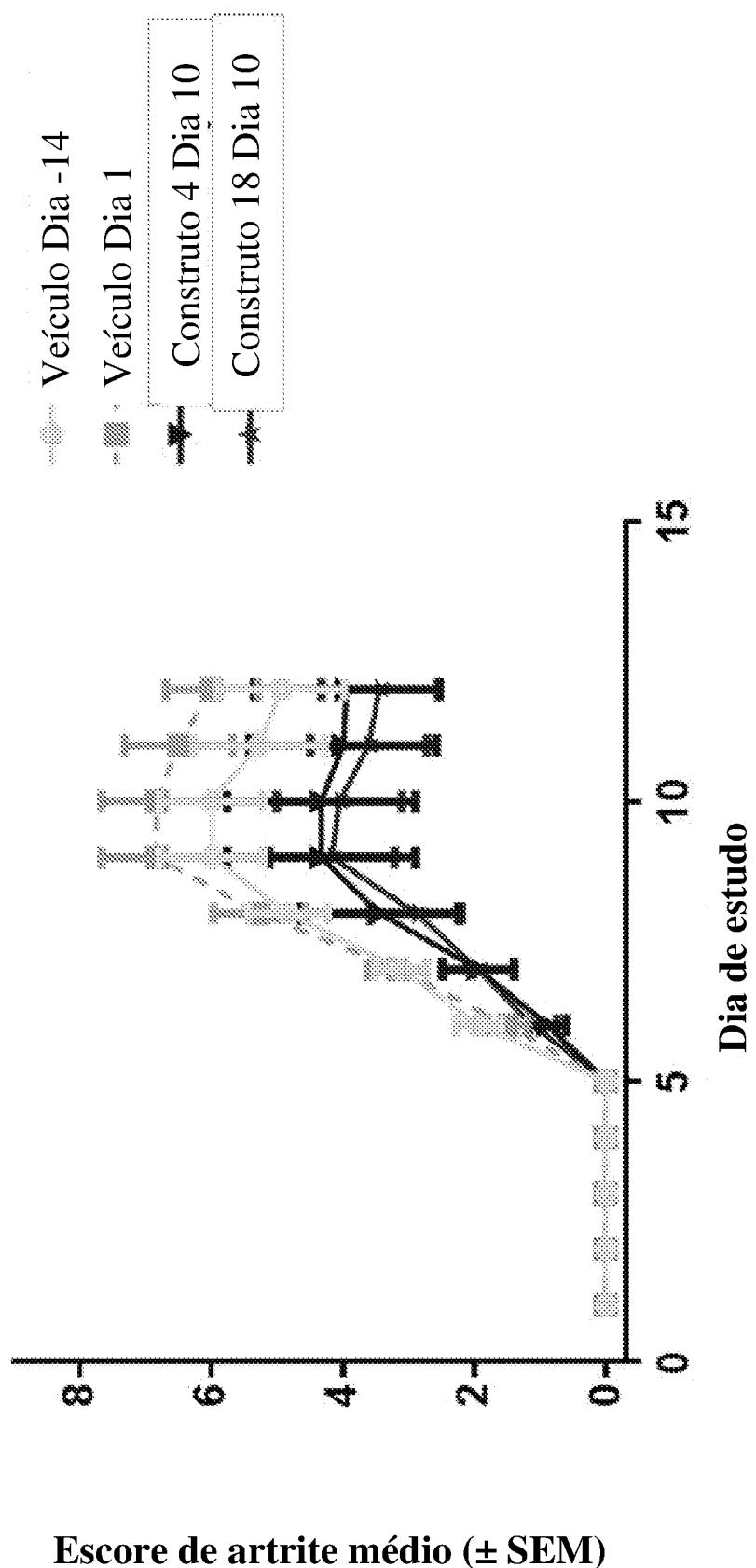
FIG. 29

FIG. 30

Escore de artrite médio (± SEM)

FIG. 31

Escore de artrite médio (\pm SEM)

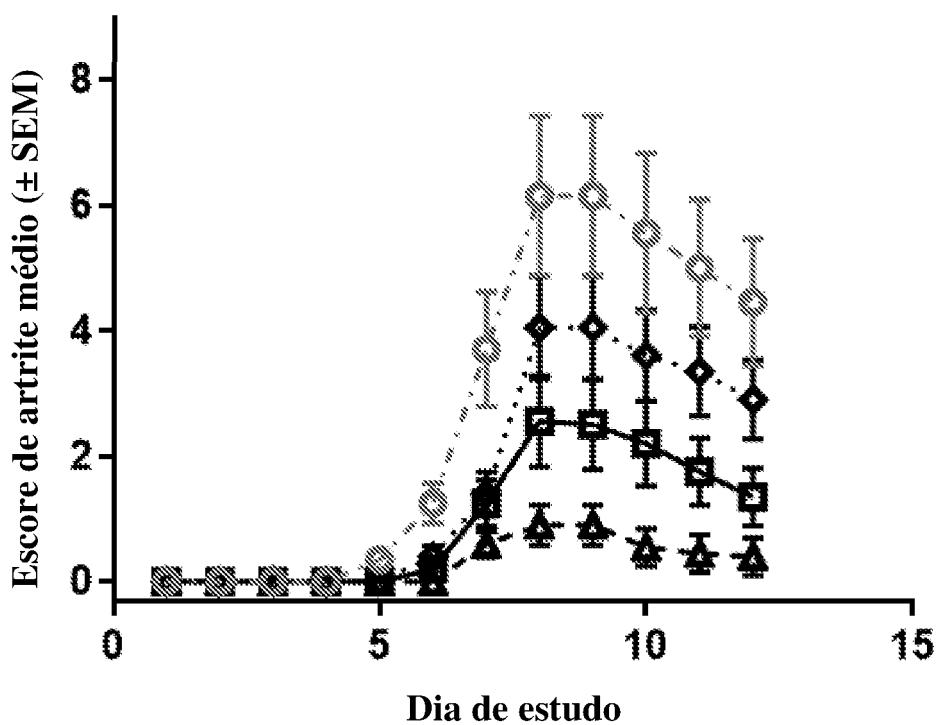
FIG. 32

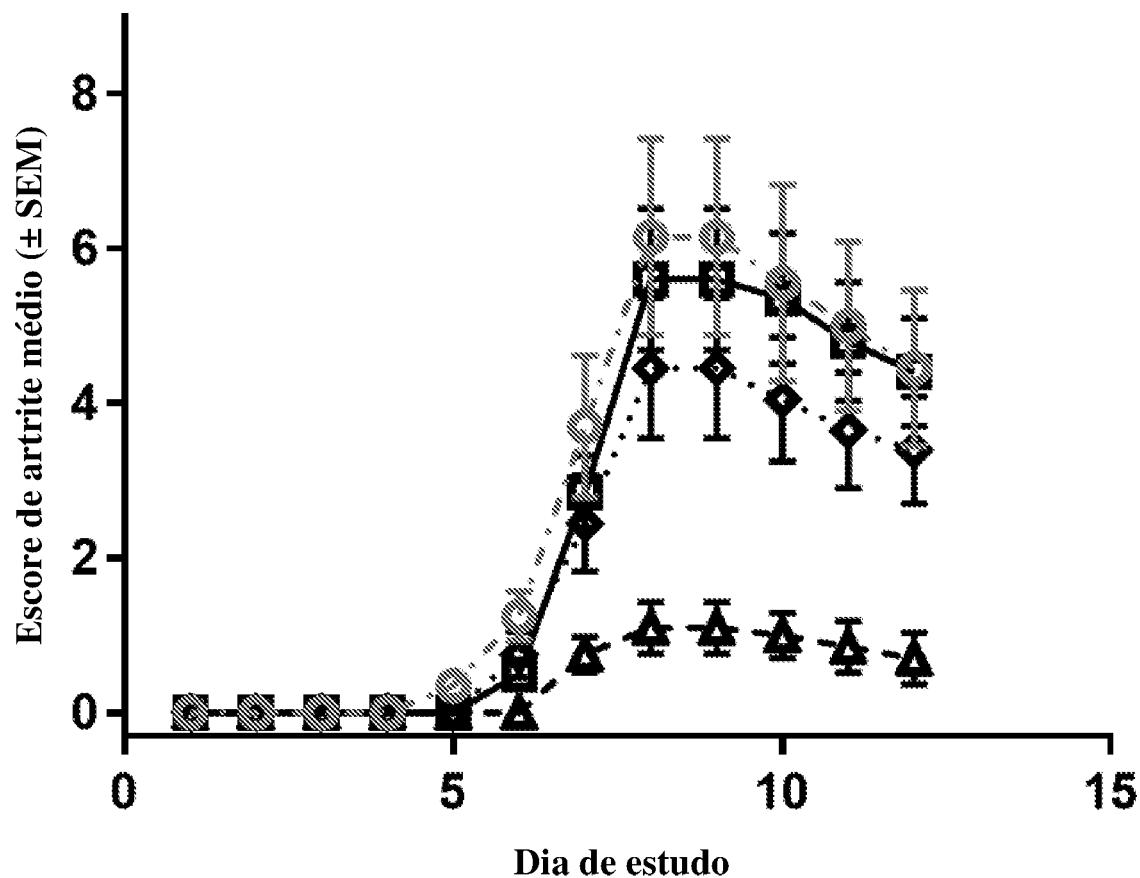
FIG. 33

FIG. 34

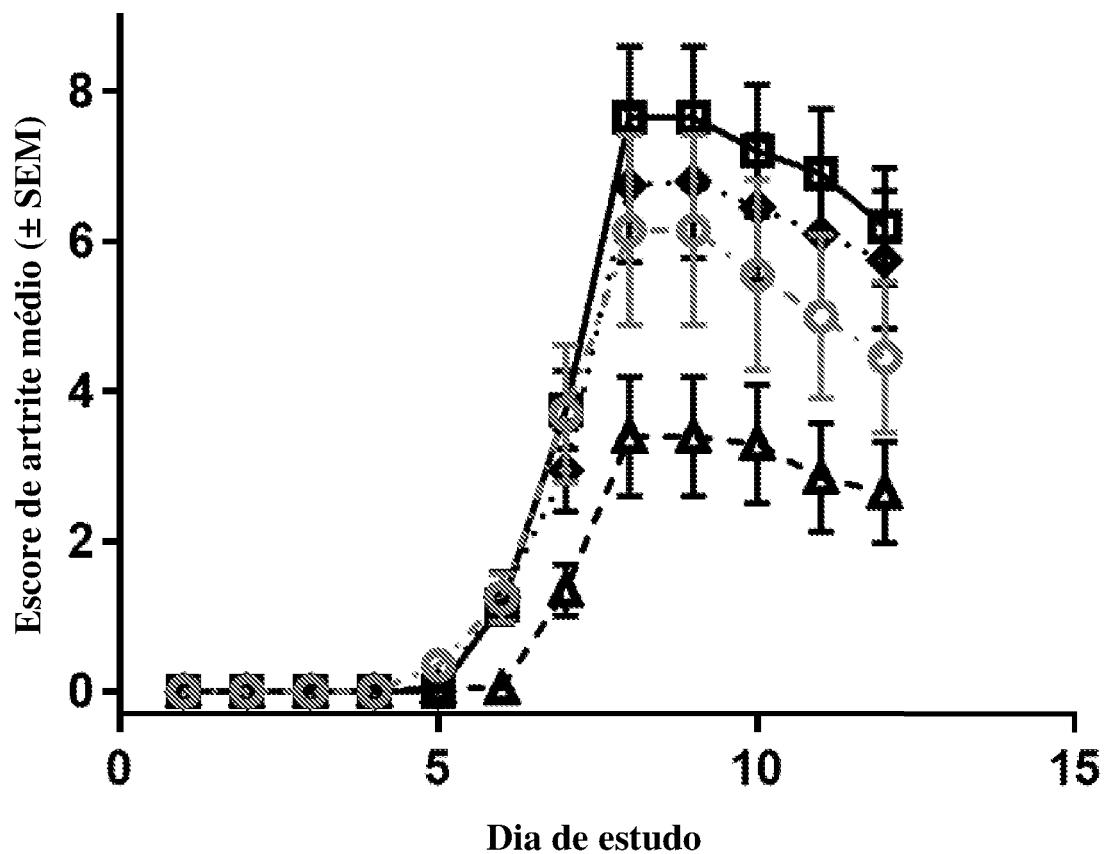


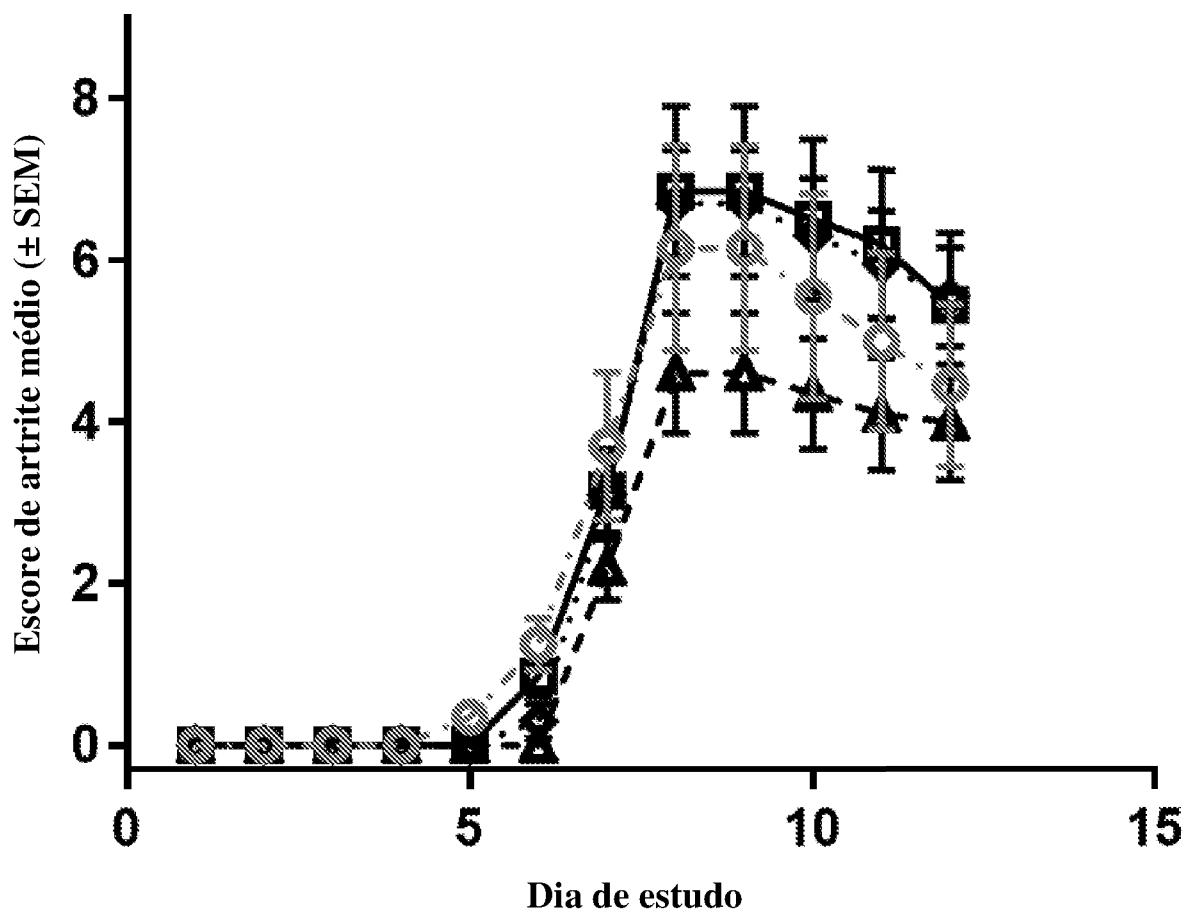
FIG. 35

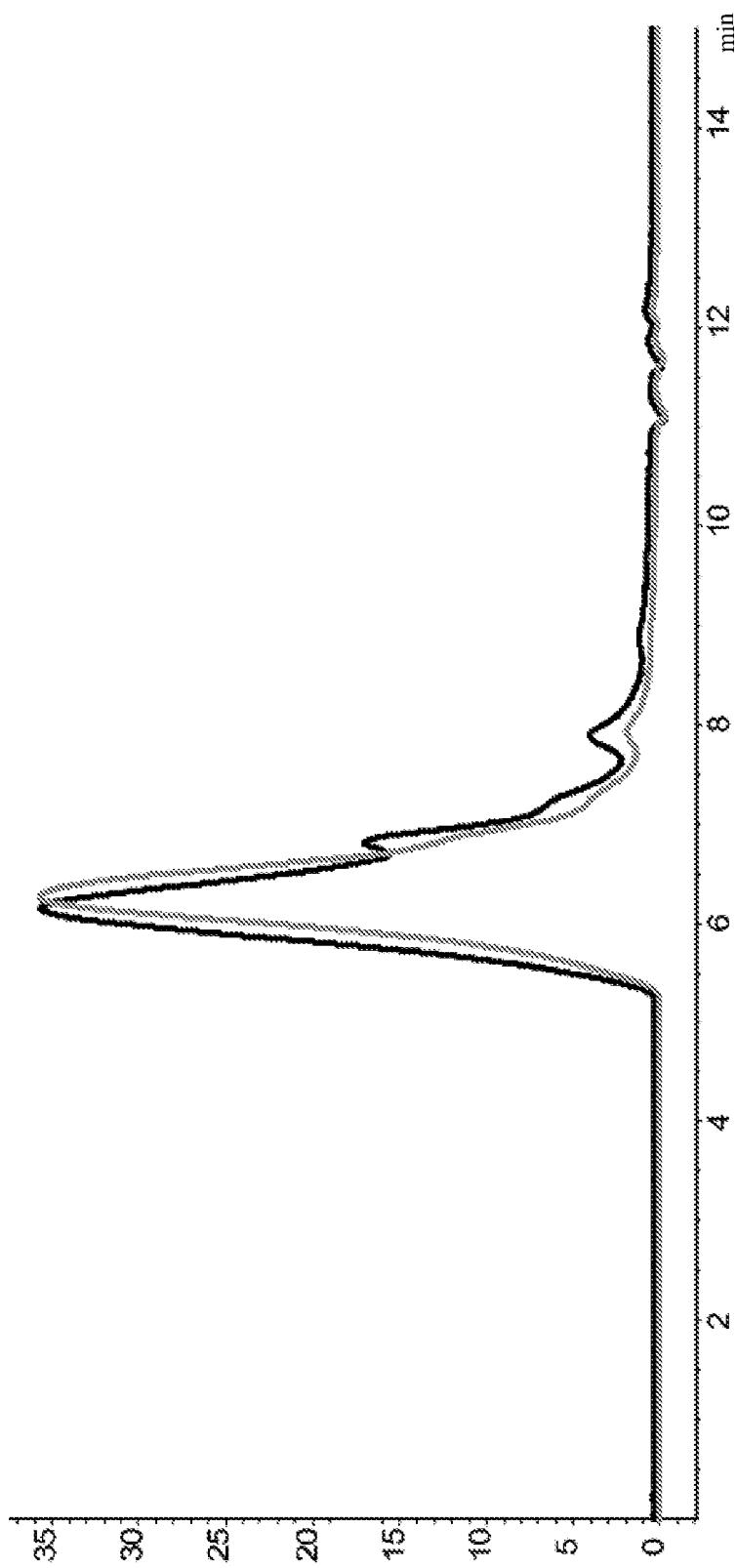
FIG. 36

FIG. 37

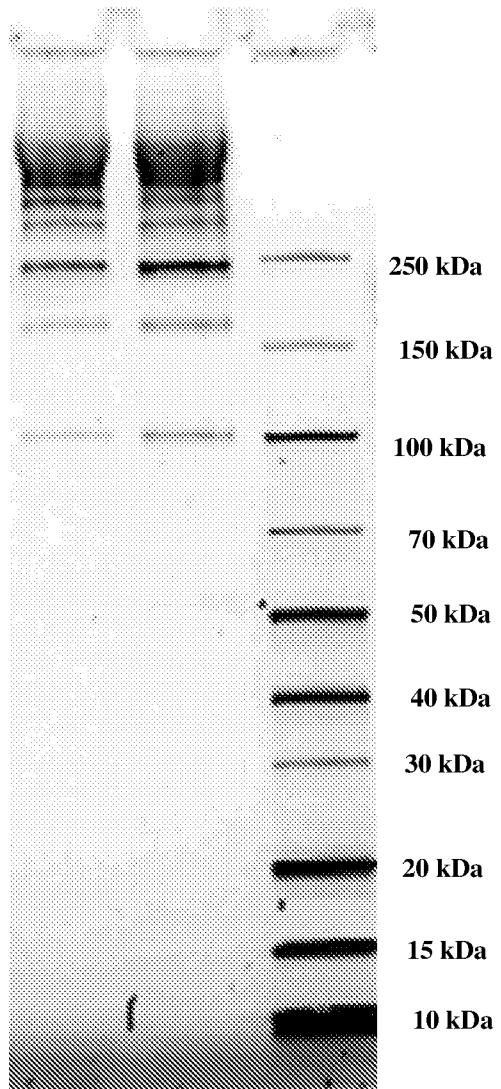


FIG. 38

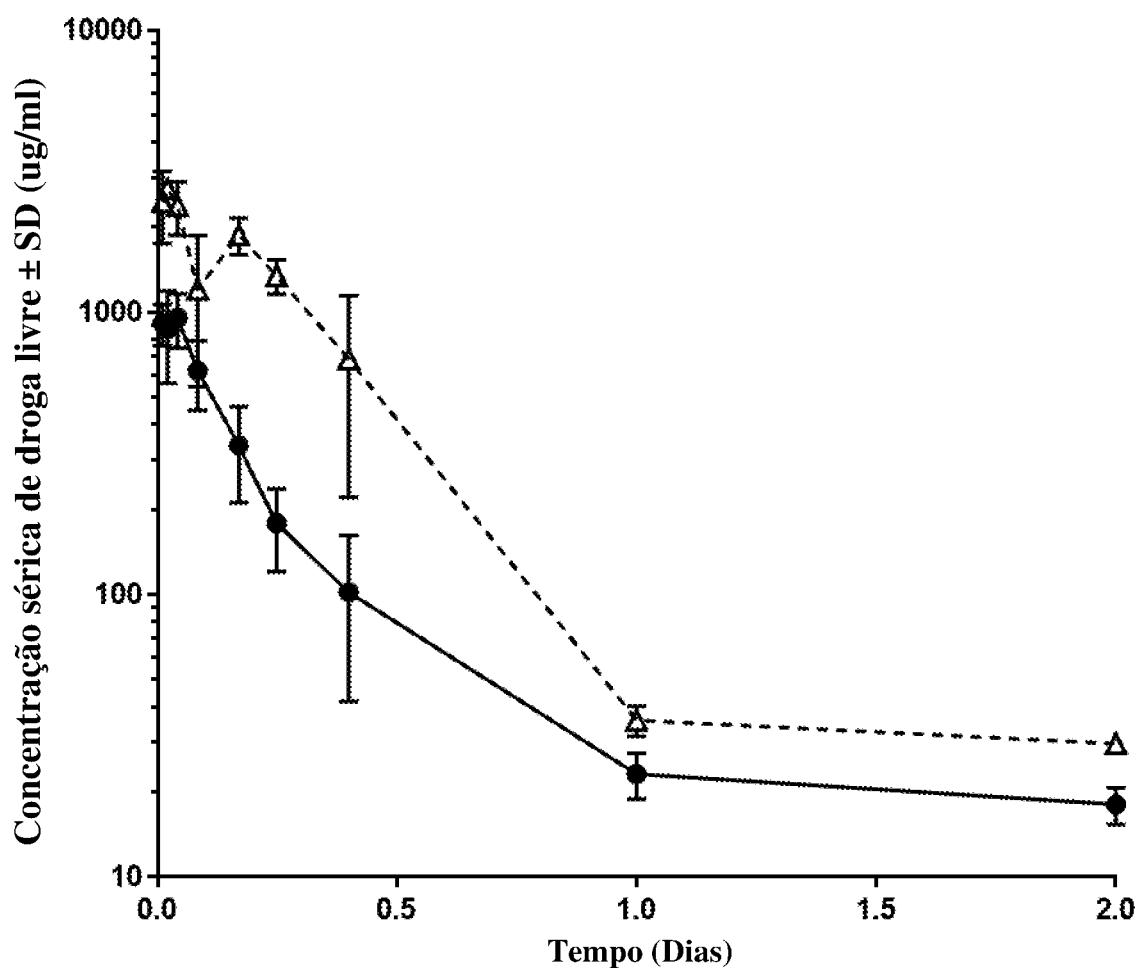


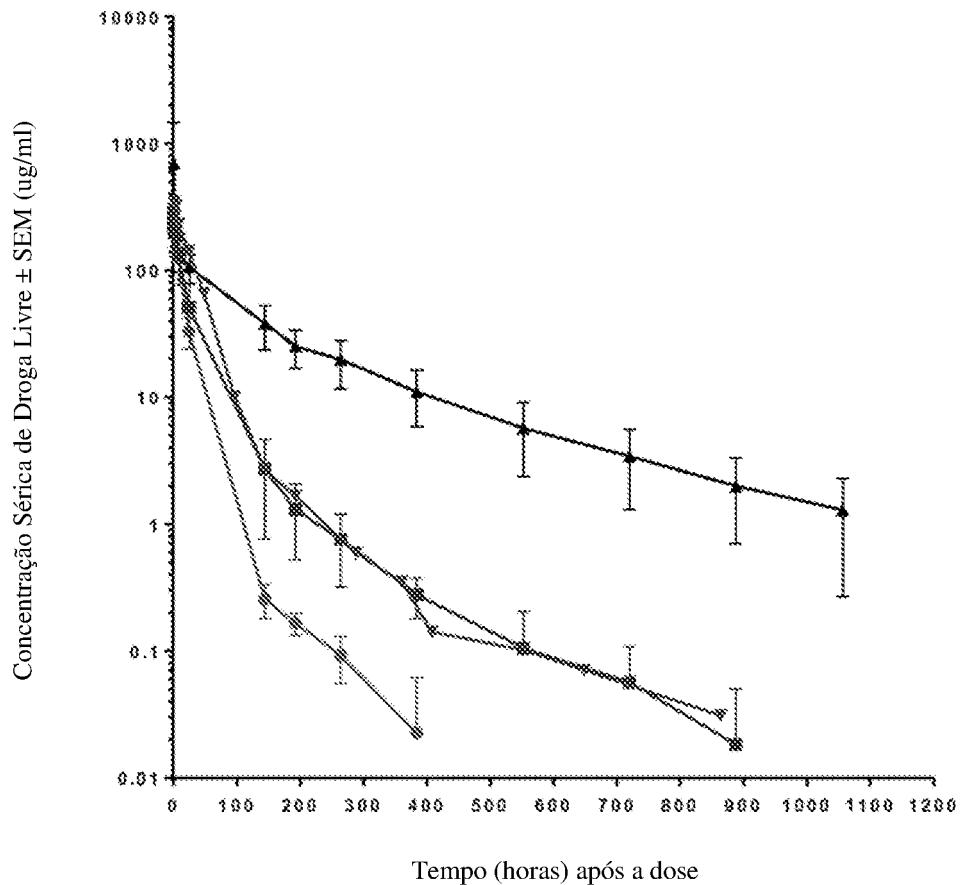
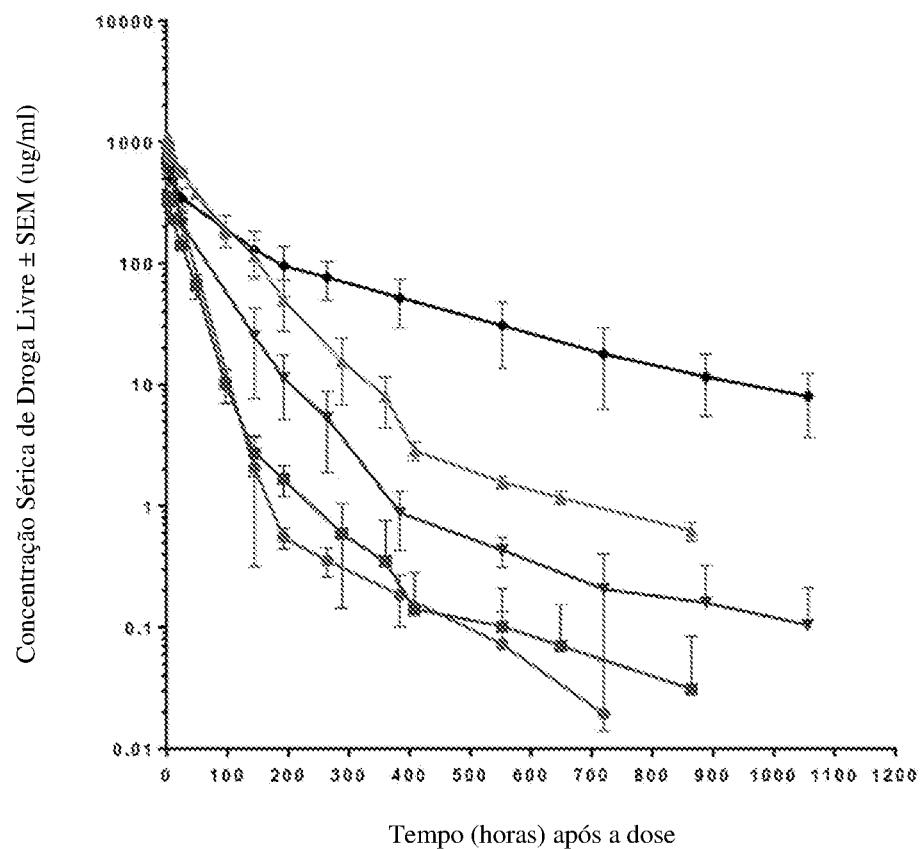
FIG. 39

FIG. 40

RESUMO

Patente de Invenção: "**COMPOSIÇÕES E MÉTODOS RELACIONADOS A CONSTRUTOS DE FC MANIPULADOS**".

A presente divulgação refere-se a construtos de Fc de IgG manipulados e a seus usos.

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

Código de Controle

Campo 1



Campo 2



Outras Informações:

- Nome do Arquivo: P241356 ListSeq (JUNTADA TRADUÇÃO).txt
- Data de Geração do Código: 19/08/2019
- Hora de Geração do Código: 15:11:53
- Código de Controle:
 - Campo 1: 4D53BF3FDA1E4591
 - Campo 2: EBB7FAC2CA7428CD