



República Federativa do Brasil

Ministério do Desenvolvimento, Indústria,
Comércio e Serviços

Instituto Nacional da Propriedade Industrial



(11) BR 122016021558-0 B1

(22) Data do Depósito: 07/03/2014

(45) Data de Concessão: 28/03/2023

(54) Título: POLIPEPTÍDEOS ISOLADOS E COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA

(51) Int.Cl.: A61K 38/18; C07K 14/475.

(30) Prioridade Unionista: 08/03/2013 US 61/775,400; 10/02/2014 US 61/938,123.

(73) Titular(es): NOVARTIS AG.

(72) Inventor(es): KRISTEN JOHNSON; JIAN SHI.

(86) Pedido PCT: PCT US2014022102 de 07/03/2014

(87) Publicação PCT: WO 2014/138687 de 12/09/2014

(85) Data do Início da Fase Nacional: 19/09/2016

(62) Pedido Original do Dividido: BR112015021269-7 - 07/03/2014

(57) Resumo: Patente de Invenção: POLIPEPTÍDEOS ISOLADOS, SEUS USOS, E COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA. A presente invenção se refere a novos polipeptídeos resistentes à protease, bem como composições e métodos para tratamento, melhora ou prevenção de condições relacionadas a dano articular, incluindo dano agudo de articulação e artrite. A invenção se refere ainda aos usos e composições farmacêuticas compreendendo os referidos polipeptídeos.

Relatório Descritivo da Patente de Invenção para **"POLI-PEPTÍDEOS ISOLADOS E COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA"**.

Dividido do BR112015021269-7, depositado em 07.03.2014.

PEDIDOS RELACIONADOS

[001] Este pedido reivindica prioridade e o benefício do Pedido de Patente Provisório dos Estados Unidos No. 61/775.400, depositado em 8 de março de 2013, e Pedido de Patente Provisório dos Estados Unidos No. 61/938.123, depositado em 10 de fevereiro de 2014, cada um do qual é, desse modo, incorporado por referência em sua totalidade.

ANTECEDENTES DA INVENÇÃO

[002] A osteoartrite (OA) representa o distúrbio do musculoesquelético mais comum. Aproximadamente 40 milhões de americanos são atualmente afetados; um número previsto para aumentar para 60 milhões dentro dos próximos vinte anos como um resultado de envelhecimento da população e um aumento na expectativa de vida, tornando-a a quarta causa condutora de deficiência. A OA é caracterizada por uma baixa quebra degenerativa de uma articulação, incluindo ambas cartilagem articular (contendo as células e matriz que produzem lubrificação e amortecimento para a articulação) e osso subcondral subjacente à cartilagem articular. A OA pode ser considerada uma consequência de vários fatores etiológicos. Por exemplo, ela pode ser causada por estresse biomecânico anormal ou anormalidades genéticas ou adquiridas de cartilagem articular ou osso. As terapias de OA atuais incluem alívio de dor com NSAIDs orais ou inibidores seletivos de ciclo-oxigenase 2 (COX-2), injeção intra-articular (IA) com agentes, tais como corticosteroides e hialuronano, e abordagens cirúrgicas.

[003] Dano articular, por exemplo, dano agudo da articulação, tal como um desgaste de menisco ou de ligamento, ou uma fratura intra-articular, podem também conduzir a artrite, por exemplo, artrite pós-

traumática. Devido a cartilagem articular ter uma capacidade limitada de se reparar, mesmo dano não detectável pequeno pode, frequentemente, piorar com o tempo, e conduzir a OA. Os tratamentos atuais para dano da articulação podem incluir cirurgia e outros procedimentos invasivos focalizados na regeneração de articulações danificadas, bem como tratamento com agentes para reduzir dor e inflamação.

[004] As células troncos mesenquimais (MSCs) estão presentes em cartilagem articular de adulto e, sob isolamento, podem ser programadas in vitro para suportar diferenciação a condrócitos, e outras linhagens de célula mesenquimal, e podem ser usadas para regeneração de cartilagem. Em parte, o processo é regulado por fatores de crescimento (TGF β s, BMPs), condições de soro, e contato célula-célula. O documento WO2011/008773 descreve composições de peptídeo e uso destas composições para tratamento ou prevenção e dano de articulação, e para indução de diferenciação de células mesenquimais em condrócitos. Adicionalmente, o documento WO2012/129562 descreve compostos de molécula pequena, composições e uso destas composições para melhora de artrite e dano de articulação, e para indução de diferenciação de células mesenquimais em condrócitos.

[005] Embora as técnicas cirúrgicas e tecnologia regenerativa tenham feito algum progresso na restauração de cartilagem, diminuição da degeneração, e reparo aperfeiçoado de dano articular, existe uma necessidade continuada de aperfeiçoamento de composições e métodos para regeneração efetiva de cartilagem, tratamento de dano articular, e melhora ou prevenção de OA.

BREVE SUMÁRIO DA INVENÇÃO

[006] A presente invenção se relaciona a identificação de novos polipeptídeo e variantes de proteína semelhante a angiopoietina 3 (ANGPTL3) que têm propriedades farmacêuticas aperfeiçoadas, por exemplo, são mais estáveis, menos susceptíveis a proteólise e degra-

dação enzimática do que ANGPTL3 tipo selvagem. Também proporcionados são composições farmacêuticas e métodos para tratamento de dano articular ou dano de articulação, e métodos de melhora ou prevenção de artrite, dano articular, ou dano de articulação em um mamífero.

[007] Desse modo, são proporcionados polipeptídeos resistentes à protease compreendendo uma sequência de aminoácido que tem pelo menos 95% de identidade de sequência de aminoácido, ou pelo menos 96%, 97%, 98%, 99% ou 100% de identidade de sequência de aminoácido para uma sequência de aminoácido selecionada de qualquer uma ou mais das sequências da TABELA 1, e conforme adicionalmente aqui descrito. Os polipeptídeos modificados da TABELA 1 incluem um aminoácido que é um aminoácido polar outro do que K ou R na posição 423, conforme determinado com referência à sequência de polipeptídeo de ANGPTL3 de comprimento total, SEQ ID NO:1. Em algumas concretizações, o aminoácido na posição 423, conforme determinada com referência à SEQ ID NO:1, é Q ou S. Em certas concretizações, o aminoácido na posição 423, conforme determinada com referência à SEQ ID NO:1, é Q. Em certas concretizações, o aminoácido na posição 423, conforme determinada com referência à SEQ ID NO:1, é S. Em certas concretizações, o aminoácido na posição 423, conforme determinada com referência à SEQ ID NO:1, é anulado. Em adição, os polipeptídeos proporcionados têm atividade condrogênica.

[008] Em algumas concretizações, o polipeptídeo compreende uma sequência tendo pelo menos 95% de identidade, ou pelo menos 96%, 97%, 98%, 99% ou 100% para qualquer uma de SEQ ID NO:30, SEQ ID NO:31, SEQ ID NO:32, SEQ ID NO:33, SEQ ID NO:34, SEQ ID NO:35, SEQ ID NO:36, SEQ ID NO:37, SEQ ID NO:38, SEQ ID NO:39, SEQ ID NO:40, SEQ ID NO:41, SEQ ID NO:65, SEQ ID NO:66, SEQ ID NO:67, SEQ ID NO:68, SEQ ID NO:69, e SEQ ID

NO:70. Em algumas concretizações, o polipeptídeo compreende uma sequência tendo pelo menos 95% de identidade, ou pelo menos 96%, 97%, 98%, 99% ou 100% para qualquer uma de SEQ ID NO:14, SEQ ID NO:15, SEQ ID NO:16, SEQ ID NO:17, SEQ ID NO:18, SEQ ID NO:19, SEQ ID NO:20, SEQ ID NO:21, SEQ ID NO:22, SEQ ID NO:23, SEQ ID NO:24, SEQ ID NO:25, SEQ ID NO:26, SEQ ID NO:27, SEQ ID NO:28, SEQ ID NO:29, SEQ ID NO:58, SEQ ID NO:59, SEQ ID NO:60, SEQ ID NO:61, SEQ ID NO:62, SEQ ID NO:63, e SEQ ID NO:64. Em algumas concretizações, o polipeptídeo compreende qualquer uma das sequências da TABELA 1. Em algumas concretizações, o polipeptídeo compreende qualquer uma de SEQ ID NO:30, SEQ ID NO:31, SEQ ID NO:32, SEQ ID NO:33, SEQ ID NO:34, SEQ ID NO:35, SEQ ID NO:36, SEQ ID NO:37, SEQ ID NO:38, SEQ ID NO:39, SEQ ID NO:40, SEQ ID NO:41, SEQ ID NO:65, SEQ ID NO:66, SEQ ID NO:67, SEQ ID NO:68, SEQ ID NO:69, e SEQ ID NO:70. Em algumas concretizações, o polipeptídeo compreende qualquer uma de SEQ ID NO:14, SEQ ID NO:15, SEQ ID NO:16, SEQ ID NO:17, SEQ ID NO:19, SEQ ID NO:20, SEQ ID NO:21, SEQ ID NO:22, SEQ ID NO:24, SEQ ID NO:25, SEQ ID NO:26, SEQ ID NO:27, SEQ ID NO:28, SEQ ID NO:29, SEQ ID NO:58, SEQ ID NO:59, SEQ ID NO:60, SEQ ID NO:61, SEQ ID NO:62, SEQ ID NO:63, e SEQ ID NO:64. Em algumas concretizações, o polipeptídeo é qualquer um das sequências da TABELA 1. Em algumas concretizações, o polipeptídeo é qualquer uma de SEQ ID NO:30, SEQ ID NO:31, SEQ ID NO:32, SEQ ID NO:33, SEQ ID NO:34, SEQ ID NO:35, SEQ ID NO:36, SEQ ID NO:37, SEQ ID NO:38, SEQ ID NO:39, SEQ ID NO:40, SEQ ID NO:41, SEQ ID NO:65, SEQ ID NO:66, SEQ ID NO:67, SEQ ID NO:68, SEQ ID NO:69, e SEQ ID NO:70. Em algumas concretizações, o polipeptídeo é qualquer uma de SEQ ID NO:14, SEQ ID NO:15, SEQ ID NO:16, SEQ ID NO:17, SEQ

ID NO:19, SEQ ID NO:20, SEQ ID NO:21, SEQ ID NO:22, SEQ ID NO:24, SEQ ID NO:25, SEQ ID NO:26, SEQ ID NO:27, SEQ ID NO:28, SEQ ID NO:29, SEQ ID NO:58, SEQ ID NO:59, SEQ ID NO:60, SEQ ID NO:61, SEQ ID NO:62, SEQ ID NO:63, e SEQ ID NO:64.

[009] Os polipeptídeos da invenção podem incorporar uma ou mais modificações químicas (por exemplo, PEGilação). Em algumas concretizações, os polipeptídeos da invenção podem compreender um peptídeo heterólogo como uma proteína de fusão, que pode, opcionalmente, ser fundido na extremidade amino-terminal ou na extremidade carbóxi-terminal do polipeptídeo. Também proporcionados são polinucleotídeos que codificam os polipeptídeos da invenção; vetores contendo polinucleotídeos que codificam os polipeptídeos; e células hospedeiras compreendendo tais vetores.

[0010] A presente invenção também proporciona composições farmacêuticas compreendendo os polipeptídeos da invenção, e um transportador farmacêuticamente aceitável. Tais composições podem ser usadas em métodos aqui proporcionados para tratar, melhorar ou prevenir artrite ou dano articular em um paciente, onde o método compreende administrar a uma articulação de um paciente uma quantidade terapêuticamente efetiva de uma composição farmacêutica da invenção. Exemplos de condições que podem se beneficiar de tais métodos incluem, mas não limitados a, artrite (por exemplo, osteoartrite, artrite traumática), e dano articular (por exemplo, dano agudo da articulação).

[0011] A presente invenção proporciona adicionalmente métodos de tratamento de um indivíduo compreendendo administrar uma método terapêuticamente efetivo de um polipeptídeo da invenção. Os métodos proporcionados incluem tratamento de um indivíduo tendo ou em risco de ter dano articular e/ou artrite, compreendendo administrar ao indivíduo uma quantidade terapêuticamente efetiva de um ou mais po-

lipeptídeos da invenção, ou uma composição farmacêutica destes. Ainda adicionalmente proporcionados são métodos de indução de diferenciação de células troncos mesenquimais em condrócitos, compreendendo contatar células troncos mesenquimais com uma quantidade efetiva de um polipeptídeo da invenção para induzir diferenciação das células troncos mesenquimais em condrócitos.

[0012] Estes e outros aspectos da invenção, incluindo características, vantagens e concretizações adicionais da invenção, serão descritos e elucidados em detalhe adicional na seguinte descrição detalhada e reivindicações em anexo da invenção.

BREVE DESCRIÇÃO DOS DESENHOS

[0013] **Figura 1** representa um esquemático de proteínas de hANGPTL3 projetadas para aperfeiçoar a estabilidade da proteína e intensificar a resistência proteolítica. Durante produção de proteína de proteína tipo selvagem e sequências de peptídeo, 100% de clivagem foi observada entre Lys423 e Ser424. Para evitar proteólise, vários peptídeos mutantes foram gerados, no qual Lys 423 foi mutado para Gln ou Ser; ou Ser424 foi mutado para Thr; ou Lys 423 foi anulado.

[0014] **Figura 2A e B** representam representações gráficas de expressão de proteínas específicas de cartilagem na presença ou ausência de ANGPTL3 e construtos projetados. As células fixadas foram manchadas com quantificação Tipo 2A Pró-colágeno **2A** (PIIANP) ou quantificação de colágeno Tipo II **2B** para determinar a % de células que se diferenciam em condrócitos seguindo tratamento conforme descrito na Exemplificação. **Figura 2C** representa representação gráfica de quantificação de ensaios de angiogênese na presença ou ausência de ANGPTL3, ou construtos projetados, conforme comparado a uma proteína de controle positivo, bFGF. Comprimento e número de tubo total de pontos de ramificação foram medições quantitativas de angiogênese. Embora outros tenham reportado atividade angiogênica em

ANGPTL3, e este estudo confirme atividade, bem como aquele de FGF; os resultados indicam que nenhuma atividade significativa é retida em um construto de C terminal ANGPTL3.

[0015] **Figura 3** são representações gráficas mostrando um aumento na expressão de proteínas específicas de cartilagem na presença de ANGPTL3 ou construtos projetados. **3A**. Células foram avaliadas dez dias seguindo tratamento usando qRT-PCR para medir expressão de RNA para proteínas específicas de cartilagem seguindo tratamento conforme descrito. Lubricina, aggrecan e Sox9 representam proteínas relacionadas a cartilagem; IGF e IFITM1 representam potencial de diferenciação, e osteocalcina e colágeno tipo X representam proteínas relacionadas a osso/fibrose. **3B**. Células foram avaliadas três dias seguindo tratamento conforme descrito. A expressão aumentada de aggrecan foi vista seguindo tratamento com construto projetado ou polipeptídeo de região C-terminal de ANGPTL1 tipo selvagem.

[0016] **Figura 4** representa representações gráficas de atividade condro-protetora de ANGPTL3 e construtos projetados. **4A**: Liberação de glicosaminoglicano (GAG), um indicador de dano de matriz, foi inibida com quantidade aumentada de ANGPTL3 e construtos mutantes. Ensaio de inibição de liberação de GAG *ex vivo* (um indicador de dano de matriz) foram realizados usando cartilagem bovina tratada na presença ou ausência de construtos conforme descrito. **4B e 4C**: NE-NHUMA liberação foi inibida com quantidade aumentada de ANGPTL3 e construtos projetados, conforme indicado. Condrócitos foram tratados na presença ou ausência de construtos conforme descrito, seguido por ensaios de reação de Greiss para determinar a inibição de NE-NHUMA liberação como um indicador de condro-proteção.

[0017] **Figura 5** representa uma representação gráfica mostrando uma inibição de expressão de colágeno tipo X (um indicador de atividade de formação de cartilagem fibrótica) na presença de construtos

sob condições hipertróficas. Os condrócitos primários foram tratados na presença de ausência de construtos sob condições hipertróficas, conforme descrito, seguido por determinação de expressão de colágeno tipo X, ensaiada por imunofluorescência, como uma medição de formação de cartilagem fibrótica e hipertrófica/diferenciação de condrócito. **5A** representa os resultados de ANGPTL3 C-terminal tipo selvagem, ou construto projetado. **5B** representa resultados de ANGPTL3 C-terminal (WT) ou construtos projetados 242KQ ou 242Kdel ou ANGPTL1 C-terminal.

[0018] **Figura 6** representa uma representação esquemática do paradigma de dosagem (**6A**), seguido por uma representação gráfica (**6B**) do aperfeiçoamento na severidade de articulação após tratamento com ANGPTL3 (17-460) de camundongo, conforme medido por classificação de erosão de cartilagem do côndilo femoral lateral.

[0019] **Figura 7.** é uma representação gráfica de medições de incapacitância (um indicador de dor) em camundongos seguindo indução cirúrgica de dano de cartilagem, e subsequente tratamento com construtos de ANGPTL3 uma vez semanalmente por três semanas (começando no dia 7). **7A** representa medições de incapacitância no dia 35 seguindo cirurgia; e **7B** representa medições tomadas no dia 56 seguindo cirurgia.

[0020] **Figura 8.** é uma representação gráfica da classificação de severidade de articulação total e aperfeiçoamento na severidade para dano de cartilagem induzida por colagenase em camundongos seguindo 3 tratamentos uma vez semanalmente (dias 7, 14 e 21) de construtos de ANGPTL3 (indicado).

[0021] **Figura 9.** representa resultados em um modelo de desgaste do menisco de rato de dano articular seguindo tratamento com construto de ANGPTL3 projetado. Figura **9A** é uma representação gráfica do teor de proteoglicano em articulações cinco semanas seguindo tra-

tamento; Figura **9B** é uma representação gráfica da classificação de severidade de articulação femoral cinco semanas seguindo tratamento. Os resultados ilustram o aperfeiçoamento do dano de cartilagem induzido por ruptura cirúrgica do menisco em ratos seguindo 3 tratamentos uma vez por semana (dias 7, 14 e 21) de construtos de ANGPTL3 (indicado).

[0022] **Figura 10** representa os resultados em modelo de desgaste de menisco de rato de dano articular seguindo tratamento com construto de ANGPTL3 projetado. Figura **10A** é uma representação gráfica de percentagem de reparo *in vivo* conforme medida por severidade, intensidade de safranina O, área da cartilagem e espessura da cartilagem. Figura **10B** é uma representação gráfica de medições de incapacitância (um indicador de dor) em ratos seguindo indução cirúrgica de dano de cartilagem e subsequente tratamento.

[0023] **Figura 11** é uma representação gráfica da classificação de severidade total bruta para ilustrar aperfeiçoamento de dano de cartilagem induzido por rompimento cirúrgico do menisco medial em cães seguindo bimensalmente dosagem começando no dia 4 (cada da 1,5 ug/dose ou 15 ug/dose), ou uma dose única 30 ug) dada no dia 7 somente.

DESCRIÇÃO DETALHADA

[0024] A presente invenção é baseada, pelo menos em parte, na identificação de polipeptídeos similares a Angiopietina 3 (ANGPTL3) que estimulam diferenciação de condrócito de células troncos mesenquimais, e que são resistentes a clivagem por proteases (por exemplo, proteases similares á tripsina). O documento WO2011/008773 descreve composições de peptídeo de ANGPTL3 e uso de composições de peptídeo para tratamento ou prevenção de artrite e dano da articulação, e para indução de diferenciação de células mesenquimais em condrócitos. Nós verificamos que proteínas de ANGPTL3 tipo selva-

gem são submetidas a corte e instabilidade de protease e têm variantes de sequência identificadas para evitar este efeito. A presente invenção, desse modo, proporciona composições de peptídeo aperfeiçoadas para reparo da cartilagem. Em particular, são proporcionados peptídeos de ANGPTL3 modificados de acordo com a presente invenção para terem resistência aumentada á protease conforme comparada a um polipeptídeo de ANGPTL3 tipo selvagem. Também proporcionados são composições e métodos para administração de polipeptídeos de ANGPTL3 para impedir ou melhorar artrite ou dano da articulação por administração de um polipeptídeo da invenção em uma articulação, um tecido de cartilagem, ou um tecido de cartilagem proximal, ou sistemicamente. Ainda, a invenção proporciona composições e métodos para indução de diferenciação de célula tronco mesenquimal em condrócitos.

Definições

[0025] O termo "resistente à protease", conforme aqui usado, se refere a um polipeptídeo compreendendo uma modificação que torna o polipeptídeo menos susceptível a clivagem por uma protease similar á tripsina do que um polipeptídeo tipo selvagem não modificado correspondente. Em concretizações específicas, um polipeptídeo resistente à protease é um polipeptídeo de ANGPTL3 que tem uma substituição de aminoácido, relativa a uma sequência de peptídeo tipo selvagem nativa, em um resíduo R ou a K.

[0026] "ANGPTL3" se refere a um membro da família de proteína de angoipoietina. Uma sequência de aminoácido de ANGPTL3 (No. de Acesso no Banco de Genes NP_055310.1) é colocada em SEQ ID NO:1; e a sequência de polinucleotídeo correspondente da qual é colocada como SEQ ID NO: 2 (número de sequência de referência NCBI NM014495.2, no qual a sequência de codificação de ANGPTL3 compreende nt 52-1434 de SEQ ID NO:2). O "polipeptídeo de ANGPTL3"

se refere a um polipeptídeo expresso que ocorre naturalmente. Para a proposta da presente revelação, a numeração de um aminoácido é tipicamente determinada com referência à sequência de polipeptídeo de ANGPTL3 humana tipo selvagem de comprimento total (SEQ ID NO:1). Desse modo, em concretizações em que um polipeptídeo da invenção contém somente uma porção C-terminal de ANGPTL3 de comprimento total, mas não a porção N-terminal, embora o peptídeo seja menos do que 460 aminoácidos de comprimento, a numeração das posições é baseada em SEQ ID NO:1. Por exemplo, referência à posição 423 de um polipeptídeo de ANGPTL3 da invenção se refere a posição 423 de SEQ ID NO:1, mesmo embora o polipeptídeo de ANGPTL3 da invenção em si pode somente ser de 200 aminoácidos de comprimento. Na determinação de um aminoácido em uma sequência de interesse que "corresponde a" uma posição em uma sequência de referência, tal como SEQ ID NO:1, isto é realizado por alinhamento otimamente das sequências, por exemplo, usando os parâmetros de alinhamento default CLUSTAL, ou parâmetros de alinhamento default BLAST 2, e comparando as sequências. Por exemplo, a posição 423 em uma sequência de interesse que é "determinada com referência a SEQ ID NO:1", ou um aminoácido que "corresponde a" posição 423 de SEQ ID NO:1, significa o aminoácido que se alinha com a posição 423 de SEQ ID NO:1 quando a sequência de interesse é otimamente alinhada com SEQ ID NO:1.

[0027] Os termos "peptidomimético" e "mimético" se referem a um composto químico sintético que tem substancialmente as mesmas características funcionais de um polipeptídeo que ocorre naturalmente ou não naturalmente (por exemplo, ANGPTL3), mas características estruturais diferentes (embora tipicamente similares). Os análogos de peptídeo são comumente usados no campo como compostos ativos de não peptídeo (por exemplo, drogas) com propriedades análogas àque-

las de um peptídeo gabarito. Tal compostos de não peptídeo são denominados "miméticos de peptídeo", ou "peptidomiméticos" (Fauchere, J. *Adv. Drug Res.* 15:29 (1986); Veber and Freidinger *TINS* p. 392 (1985); e Evans *et al. J. Med. Chem.* 30:1229 (1987)). Os miméticos de peptídeo que são estruturalmente similares a peptídeos terapêuticamente úteis podem ser usados para produzir um efeito terapêutico ou profilático equivalente ou intensificado. Geralmente, os peptidomiméticos são estruturalmente similares a um polipeptídeo de paradigma (isto é, um polipeptídeo que tem uma atividade biológica ou farmacológica), tal como encontrado em um polipeptídeo de interesse, mas tem uma ou mais ligações de peptídeo opcionalmente substituídas por uma ligação selecionada a partir do grupo consistindo em, por exemplo, $-\text{CH}_2\text{NH}-$, $-\text{CH}_2\text{S}-$, $-\text{CH}_2\text{-CH}_2-$, $-\text{CH}=\text{CH}-$ (cis e trans), $-\text{COCH}_2-$, $-\text{CH}(\text{OH})\text{CH}_2-$, e $-\text{CH}_2\text{SO}-$. Um mimético pode ser, ou totalmente composto de análogos não naturais sintéticos de aminoácidos, ou, é uma molécula quimérica de aminoácidos de peptídeo parcialmente naturais e análogos de aminoácidos parcialmente não naturais. Um mimético pode também incorporar qualquer quantidade de substituições conservativas de aminoácido naturais, considerando-se que tais substituições também não alteram substancialmente a estrutura mimética e/ou atividade. Por exemplo, uma composição mimética está dentro do escopo da invenção se ela é capaz de atividade condrogênica de um polipeptídeo de ANGPTL3.

[0028] Os termos "polipeptídeo", "peptídeo" e "proteína" são usados intercambiavelmente aqui para se referir a um polímero de resíduos de aminoácido. Os termos se aplicam a polímeros de aminoácido em que um ou mais resíduos de aminoácido é um mimético químico artificial de um aminoácido que ocorre naturalmente correspondente, bem como polímeros de aminoácido que ocorrem naturalmente correspondente e polímeros de aminoácido que ocorrem não naturalmen-

te. Os polipeptídeos, peptídeos, e proteínas da invenção compreendem peptidomiméticos de ANGPTL3 resistentes à protease tendo atividade condrogênica.

[0029] O termo "aminoácido" se refere a aminoácidos sintéticos e que ocorrem naturalmente, bem como análogos de aminoácido, e miméticos de aminoácido que funcionam em uma maneira similar a aminoácidos que ocorrem naturalmente. Os aminoácidos que ocorrem naturalmente são aqueles codificados pelo código genético, bem como aqueles aminoácidos que são mais tarde modificados, por exemplo, hidroxiprolina, γ -carboxiglutamato, e O-fosfoserina. Os análogos de aminoácido se referem a compostos que têm a mesma estrutura química básica como um aminoácido que ocorre naturalmente, isto é, um carbono α que é ligado a um hidrogênio, um grupo carboxila, um grupo amino, e um grupo R, por exemplo, homoserina, norleucina, sulfóxido de metionina, metionina metil sulfônico. Tais análogos têm grupos R modificados (por exemplo, norleucina), ou suportes de peptídeo modificados, mas retêm a mesma estrutura química básica como um aminoácido que ocorre naturalmente. Os aminoácidos naturalmente codificados são os 20 aminoácidos comuns (alanina, arginina, asparagina, ácido aspártico, cisteína, glutamina, ácido glutâmico, glicina, histidina, isoleucina, leucina, lisina, metionina, fenilalanina, propina, serina, treonina, triptofano, tirosina, e valina), bem como pirrolisina, pirrolina-carbóxi-lisina, e selenocisteína.

[0030] "Variantes conservativamente modificadas" se aplicam a ambas sequências de aminoácido e de ácido nucleico. Com relação às sequências de ácido nucleico particulares, variantes conservativamente modificadas se referem àqueles ácidos nucleicos que codificam sequências de aminoácido idênticas ou essencialmente idênticas, ou onde o ácido nucleico não codifica uma sequência de aminoácido, para sequências essencialmente idênticas. Devido a degeneração do códi-

go genético, um grande número de ácidos nucleicos funcionalmente idênticos codifica qualquer dada proteína. Por exemplo, os códons GCA, GCC, GCG e GCU todos codificam o aminoácido alanina. Desse modo, em toda posição onde uma alanina é especificada por um códon, o códon pode ser alterado a qualquer dos códons correspondentes descritos sem alterar o polipeptídeo codificado. Tais variações de ácido nucleico são "variações silenciosas", que são uma espécie de variações conservativamente modificadas. Toda sequência de polipeptídeo aqui que é codificada por um polinucleotídeo envolve toda variação silenciosa possível do ácido nucleico. Um técnico no assunto reconhecerá que cada códon em um ácido nucleico (exceto AUG, que é ordinariamente o único códon para metionina, e TGG, que é ordinariamente o único códon para triptofano), pode ser modificado para produzir uma molécula funcionalmente idêntica. Conseqüentemente, cada variação silenciosa de um ácido nucleico que codifica um polipeptídeo está implícita em cada sequência descrita.

[0031] Um versado reconhecerá que substituições, anulações ou adições adicionais a um ácido nucleico, peptídeo, polipeptídeo, ou sequência de proteína que altera, adiciona ou anula um aminoácido único, ou uma percentagem pequena de aminoácidos com referência a uma sequência de aminoácido codificada original resultam em uma "variante conservativamente modificada" onde a alteração produz substituição de um aminoácido com um aminoácido quimicamente similar e/ou uma sequência de polipeptídeo que produz uma proteína estruturalmente similar tendo atividade funcional similar para a proteína original. Tabelas de substituição conservativa que proporcionam aminoácidos funcionalmente similares são bem conhecidas na técnica. Tais variantes conservativamente modificadas são em adição a, e não excluem variantes polimórficas, homólogos de interespecie, e alelos da invenção.

[0032] O termo "substituições conservativas de aminoácido" se refere a substituição (conceitualmente ou de outro modo) de um aminoácido de um tal grupo com um aminoácido diferente a partir do mesmo grupo. Um exemplo de substituições é baseado na análise das frequências normalizadas de mudanças de aminoácido entre proteínas correspondentes de organismos homólogos (ver, por exemplo, Schulz, G. E. and R. H. Schirmer, *Principles of Protein Structure*, Springer-Verlag). De acordo com tais análises, grupos de aminoácidos podem ser definidos onde os aminoácidos dentro de um grupo trocam preferencialmente entre si e, portanto, se assemelham entre si principalmente em seu impacto na estrutura de proteína total (ver, por exemplo, Schulz, G. E. and R. H. Schirmer, *Principles of Protein Structure*, Springer-Verlag). Um exemplo de um conjunto de grupos de aminoácido definido nesta maneira incluem: (i) um grupo carregado, consistindo em Glu e Asp, Lys, Arg e His; (ii) um grupo positivamente carregado, consistindo em Lys, Arg e His; (iii) um grupo negativamente carregado, consistindo em Glu e Asp; (iv) um grupo aromático, consistindo em Phe, Tyr e Trp; (v) um grupo de anel de nitrogênio, consistindo em His e Trp; (vi) um grupo não polar alifático grande, consistindo em Val, Leu e Ile; (vii) um grupo levemente polar, consistindo em Met e Cys; (viii) um grupo de resíduo pequeno, consistindo em Ser, Thr, Asp, Asn, Gly, Ala, Glu, Gln e Pro; (ix) um grupo alifático consistindo em Val, Leu, Ile, Met e Cys; e (x) um grupo hidroxila pequeno consistindo em Ser e Thr. Outros exemplos de substituições conservativas baseados em propriedades físicas compartilhadas são as substituições dentro dos seguintes grupos :1) Alanina (A), Glicina (G); 2) Ácido aspártico (D), Ácido glutâmico (E); 3) Asparagina (N), Glutamina (Q); 4) Arginina (R), Lisina (K); 5) Isoleucina (I), Leucina (L), Metionina (M), Valina (V); 6) Fenilalanina (F), Tirosina (Y), Triptofano (W); 7) Serina (S), Treonina (T); e 8) Cisteína (C), Metionina (M) (ver, por exemplo, Creighton, *Proteins*

(1984)).

[0033] "Percentagem de identidade de sequência" é determinada por comparação de duas sequências otimamente alinhadas sobre uma janela de comparação, no qual a porção da sequência de aminoácido, ou da sequência de polinucleotídeo, na janela de comparação, pode compreender adições ou anulações (*isto é*, folgas), conforme comparadas à sequência de referência (por exemplo, um polipeptídeo da invenção), que não compreende adições ou anulações, para alinhamento ótimo das duas sequências. A percentagem é calculada pela determinação do número de posições nas quais a base de ácido nucleico idêntica, ou resíduo de aminoácido, ocorre em ambas sequências para produzir o número de posições equiparadas, dividindo o número de posições equiparadas pelo número total de posições na janela de comparação, e multiplicando o resultado por 100 para produzir a percentagem de identidade de sequência.

[0034] Os termos "idêntico" ou percentagem de "identidade", no contexto de duas ou mais sequências de ácidos nucleicos ou de polipeptídeo, se referem a duas ou mais sequências ou subsequências que são as mesmas sequências. Duas sequências são "substancialmente idênticas" se duas sequências têm uma percentagem especificada de resíduos de aminoácido ou nucleotídeos que são os mesmos (*isto é*, 95% de identidade, opcionalmente, 96%, 97%, 98%, ou 99% de identidade sobre uma região especificada, ou, quando não especificada, sobre a sequência total), quando comparada e alinhada para correspondência máxima sobre uma janela de comparação, ou região designada conforme medida usando um dos seguintes algoritmos de comparação de sequência, ou por alinhamento manual e inspeção visual. A invenção proporciona polipeptídeos que são substancialmente idênticos aos polipeptídeos, respectivamente, aqui exemplificados (por exemplo, qualquer de SEQ ID NOs: 11-42), bem como usos destes

incluindo, mas não limitados a, uso para tratamento ou prevenção de artrite ou dano da articulação. Opcionalmente, para ácidos nucleicos, a identidade existe sobre uma região que é pelo menos cerca de 150 nucleotídeos de comprimento, ou mais, de preferência, sobre uma região que é 300 a 450 ou 600 ou mais nucleotídeos de comprimento, ou o comprimento total da sequência de referência. Para a sequência de aminoácido, opcionalmente, a identidade existe sobre uma região que é pelo menos cerca de 50 aminoácidos de comprimento, ou, mais de preferência, sobre uma região que é 100 a 150 ou 200 ou mais aminoácidos de comprimento, ou o comprimento total da sequência de referência.

[0035] Para comparação de sequência, tipicamente uma sequência age como uma sequência de referência a qual sequências testes são comparadas. Quando se usa um algoritmo de comparação de sequência, sequências de teste e de referência são admitidas em um computador, coordenadas de subsequência são designadas, se necessário, e parâmetros de programa de algoritmo de sequência são designados. Os parâmetros de programa default podem ser usados, ou parâmetros alternativos podem ser designados. O algoritmo de comparação de sequência, em seguida, calcula a percentagem de identidades de sequência para as sequências de teste relativa à sequência de referência, baseado nos parâmetros do programa.

[0036] Uma "janela de comparação", conforme aqui usado, inclui referência a um segmento de qualquer um do número de posições contíguas selecionadas a partir do grupo consistindo em 50 a 600, usualmente cerca de 75 a cerca de 200, mais usualmente cerca de 100 a cerca de 150, em que uma sequência pode ser comparada a uma sequência de referência do mesmo número de posições contíguas após as duas sequências serem otimamente alinhadas. Métodos de alinhamento de sequências para comparação são bem conhecidos

na técnica. O alinhamento ótimo de sequências para comparação pode ser conduzido, por exemplo, pelo algoritmo de homologia local de Smith and Waterman (1970) *Adv. Appl. Math.* 2:482c, pelo algoritmo de alinhamento de homologia de Needleman and Wunsch (1970) *J. Mol. Biol.* 48:443, pela pesquisa para método de similaridade de Pearson and Lipman (1988) *Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA* 85:2444, por implementações computadorizadas destes algoritmos (GAP, BESTFIT, FASTA, e TFASTA), ou por alinhamento manual e inspeção visual (ver, por exemplo, Ausubel *et al.*, *Current Protocols in Molecular Biology* (1995 suplemento)).

[0037] Dois exemplos de algoritmos que são adequados para determinação da percentagem de identidade de sequência e similaridade de sequência são os algoritmos BLAST e BLAST 2.0, que são descritos em Altschul *et al.* (1977) *Nuc. Acids Res.* 25:3389-3402, and Altschul *et al.* (1990) *J. Mol. Biol.* 215:403-410, respectivamente. Software para realização de análise de BLAST é publicamente disponível através do National Center for Biotechnology Information. Este algoritmo envolve primeiro identificação de pares de sequência de alta classificação (HSPs) por identificação de palavras curtas de comprimento W na sequência de pesquisa, que, ou se equipara, ou satisfaz alguma classificação de limite de valor positivo T quando alinhada com uma palavra do mesmo comprimento em uma sequência de base de dados. T é referido como o limite de classificação de palavra vizinho (Altschul *et al.*, *supra*). Estes acessos de palavra vizinha iniciais agem como sementes para iniciar pesquisas para encontrar HSPs mais longos contendo as mesmas. A palavra acessis são estendidas e, ambas as direções ao longo de cada sequência para, já que a classificação de alinhamento cumulativa pode ser aumentada. As classificações cumulativas são calculadas usando, para sequências de nucleotídeo, os parâmetros M (classificação de retribuição para um par de resíduos de

equiparação; sempre > 0) e N (classificação de penalidade para resíduos de desequiparação; sempre < 0). Para sequências de aminoácido, uma matriz de classificação é usada para calcular a classificação cumulativa. A extensão dos acessos de palavra em cada direção é interrompida quando: a classificação de alinhamento cumulativo falha pela quantidade X de seu valor alcançado máximo; a classificação cumulativa vai a zero ou abaixo de zero, devido ao acúmulo de um ou mais alinhamentos de resíduo de classificação negativos; ou a extremidade de qualquer sequência é alcançada. Os parâmetros de algoritmo BLAST W, T, e X determinam a sensibilidade e velocidade do alinhamento. O programa BLASTN (para sequências de nucleotídeo) usa como defaults um comprimento de palavra (W) de 11, uma expectativa (E) ou 10, M=5, N=-4, e uma comparação de ambos trançados. Para sequências de aminoácido, o programa BLASTP usa como defaults um comprimento de palavra de 3, e expectativa (E) de 10, e a matriz de classificação BLOSUM62 (ver Henikoff and Henikoff (1989) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:10915) alinhamentos (B) de 50, expectativa (E) de 10, M=5, N=-4, e uma comparação de ambos os trançados.

[0038] O algoritmo BLAST também realiza uma análise estatística da similaridade entre duas sequências (ver, por exemplo, Karlin and Altschul (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:5873-5787). Uma medida de similaridade proporcionada pelo algoritmo BLAST é a menor probabilidade de soma ($P(N)$), que proporciona uma indicação da probabilidade pela qual uma equiparação entre dois nucleotídeos ou sequências de aminoácido ocorrerá por chance. Por exemplo, um ácido nucleico é considerado similar a uma sequência de referência se a probabilidade de soma menor em uma comparação do ácido nucleico teste para o ácido nucleico de referência é menor do que cerca de 0,2, mais de preferência, menor do que cerca de 0,01, e, mais de preferência, menor do que cerca de 0,001.

[0039] O termo "isolado", quando aplicado a um ácido nucleico ou proteína, denota que o ácido nucleico ou proteína é purificado para ser essencialmente livre de outros componentes celulares que ele é associado no estado natural. Ele está frequentemente em um estado homogêneo ou quase homogêneo. Ele pode estar em, ou uma solução seca, ou em solução aquosa. A pureza e homogeneidade pode ser determinada usando técnicas de química analítica conhecidas e usadas tipicamente na técnica, por exemplo, eletroforese de gel de poliacrilamida, cromatografia líquida de alto desempenho, etc. Uma proteína que é a espécie predominante presente em uma preparação é substancialmente purificada. O termo "purificada", em algumas concretizações, denota que uma proteína dá ocorrência a essencialmente uma faixa em um gel eletroforético. Tipicamente, significa que uma proteína é pelo menos 85% pura, mais de preferência, pelo menos 95% pura, e, mais de preferência, pelo menos 99% pura.

[0040] O termo "ácido hialurônico" é aqui usado para incluir derivados de ácido hialurônico que incluem ésteres de ácido hialurônico, sais de ácido hialurônico, e também incluem o termo hialuronan. A designação também inclui ambas formas de baixo e alto peso molecular de hialuronans e hialuronans reticuladas, ou hilans. Exemplos de tais hialuronans são Synvisc™ (Genzyme Corp. Cambridge, Mass.), ORTHOVISC™ (Anika Therapeutics, Woburn, Mass.), HYALGAN™ (Sanofi-Synthelabo Inc., Malvern, Pa.), e ProVisc (Alcon/Novartis).

[0041] Conforme usado neste relatório descritivo e nas reivindicações em anexo, as formas singulares "um", "uma", e "o" incluem referentes plurais, a menos que o contexto determine claramente de outro modo.

[0042] Polipeptídeos resistentes à protease similares à angiopoietina 3

[0043] Tipo Angiopoietina 3 é um membro da família similar á an-

giopietina de fatores secretados. Ela é predominantemente expressa no fígado, e tem a estrutura característica de angiopietinas, consistindo em um peptídeo de sinal, domínio coiled-coil N-terminal (CCD), e o domínio similar à fibronogênio (FBN) C-terminal. A tipo angiopietina 3 mostrou-se ligar $\alpha V/\beta 3$ integrinas, e domínio similar a FBN sozinho foi suficiente para induzir adesão de célula endotelial e angiogênese *in vivo* (Camenisch *et al.*, *J. Biol. Chem.* 277: 17281-17290, 2002). A ANGPTL3 endógena é geralmente clivada *in vivo* em fragmentos amino-terminal e carbóxi-terminal. Conforme resumido e adicionalmente aqui descrito, a presente invenção contempla o uso de várias proteínas de ANGPTL3 resistentes à protease tendo atividade condrogênica.

[0044] Em algumas concretizações, um polipeptídeo isolado compreende uma sequência de aminoácido que tem pelo menos 95% de identidade, ou pelo menos 96%, 97%, 98%, ou 99% de identidade, a uma sequência de aminoácido selecionada de qualquer uma das sequências da TABELA 1, no qual o polipeptídeo compreende um aminoácido que é um aminoácido polar outro do que K ou R na posição 423, ou o polipeptídeo compreende uma anulação na posição 423, conforme determinada com referência à SEQ ID NO:1. Os polipeptídeos da invenção têm atividade condrogênica. Em algumas concretizações, um polipeptídeo compreende a sequência de aminoácido que tem pelo menos 95% de identidade, ou pelo menos 96%, 97%, 98%, ou 99% de identidade, para uma sequência de aminoácido selecionada de qualquer uma de SEQ ID NO:30, SEQ ID NO:31, SEQ ID NO:32, SEQ ID NO:33, SEQ ID NO:34, SEQ ID NO:35, SEQ ID NO:36, SEQ ID NO:37, SEQ ID NO:38, SEQ ID NO:39, SEQ ID NO:40, SEQ ID NO:41, SEQ ID NO:65, SEQ ID NO:66, SEQ ID NO:67, SEQ ID NO:68, SEQ ID NO:69, ou SEQ ID NO:70, no qual o polipeptídeo compreende um aminoácido que é um aminoácido polar outro do que K ou R na posição 423, ou o polipeptídeo compreende

uma anulação na posição 423, conforme determinada com referência à SEQ ID NO:1, e o polipeptídeo tem atividade condrogênica. Em uma concretização adicional, um polipeptídeo compreende a sequência de aminoácido que tem pelo menos 95% de identidade, ou pelo menos 96%, 97%, 98%, ou 99% de identidade, para uma sequência de aminoácido selecionada de qualquer uma de SEQ ID NO:14, SEQ ID NO:15, SEQ ID NO:16, SEQ ID NO:17, SEQ ID NO:18, SEQ ID NO:19, SEQ ID NO:20, SEQ ID NO:21, SEQ ID NO:22, SEQ ID NO:23, SEQ ID NO:24, SEQ ID NO:25, SEQ ID NO:26, SEQ ID NO:27, SEQ ID NO:28, SEQ ID NO:29, SEQ ID NO:58, SEQ ID NO:59, SEQ ID NO:60, SEQ ID NO:61, SEQ ID NO:62, SEQ ID NO:63, ou SEQ ID NO:64, no qual o polipeptídeo compreende um aminoácido que é um aminoácido polar outro do que K ou R na posição 423, conforme determinada com referência à SEQ ID NO:1, e o polipeptídeo tem atividade condrogênica.

[0045] Em algumas concretizações, um polipeptídeo isolado compreende uma sequência de aminoácido selecionada de qualquer uma das sequências da TABELA 1, no qual o polipeptídeo compreende um aminoácido que é um aminoácido polar outro do que K ou R na posição 423, ou o polipeptídeo compreende uma anulação na posição 423, conforme determinada com referência à SEQ ID NO:1, e o polipeptídeo tem atividade condrogênica. Em algumas concretizações, um polipeptídeo compreende uma sequência de aminoácido selecionada de qualquer uma de SEQ ID NO:30, SEQ ID NO:31, SEQ ID NO:32, SEQ ID NO:33, SEQ ID NO:34, SEQ ID NO:35, SEQ ID NO:36, SEQ ID NO:37, SEQ ID NO:38, SEQ ID NO:39, SEQ ID NO:40, SEQ ID NO:41, SEQ ID NO:65, SEQ ID NO:66, SEQ ID NO:67, SEQ ID NO:68, SEQ ID NO:69, ou SEQ ID NO:70, no qual o polipeptídeo compreende um aminoácido que é um aminoácido polar outro do que K ou R na posição 423, ou o polipeptídeo compreende uma anulação

na posição 423, conforme determinada com referência à SEQ ID NO:1, e o polipeptídeo tem atividade condrogênica. Em uma concretização adicional, um polipeptídeo compreende uma sequência de aminoácido selecionada de qualquer uma de SEQ ID NO:14, SEQ ID NO:15, SEQ ID NO:16, SEQ ID NO:17, SEQ ID NO:18, SEQ ID NO:19, SEQ ID NO:20, SEQ ID NO:21, SEQ ID NO:22, SEQ ID NO:23, SEQ ID NO:24, SEQ ID NO:25, SEQ ID NO:26, SEQ ID NO:27, SEQ ID NO:28, SEQ ID NO:29, SEQ ID NO:58, SEQ ID NO:59, SEQ ID NO:60, SEQ ID NO:61, SEQ ID NO:62, SEQ ID NO:63, ou SEQ ID NO:64, no qual o polipeptídeo compreende um aminoácido que é um aminoácido polar outro do que K ou R na posição 423, conforme determinada com referência à SEQ ID NO:1, e o polipeptídeo tem atividade condrogênica.

[0046] Em algumas concretizações, um polipeptídeo isolado tem pelo menos 95% de identidade, ou pelo menos 96%, 97%, 98%, ou 99% de identidade, para uma sequência de aminoácido selecionada de qualquer uma das sequências da TABELA 1, no qual o polipeptídeo compreende um aminoácido que é um aminoácido polar outro do que K ou R na posição 423, ou o polipeptídeo compreende uma anulação na posição 423, conforme determinada com referência à SEQ ID NO:1, e o polipeptídeo tem atividade condrogênica. Em algumas concretizações, um polipeptídeo tem pelo menos 95% de identidade, ou pelo menos 96%, 97%, 98%, ou 99% de identidade, para uma sequência de aminoácido selecionada de qualquer uma de SEQ ID NO:30, SEQ ID NO:31, SEQ ID NO:32, SEQ ID NO:33, SEQ ID NO:34, SEQ ID NO:35, SEQ ID NO:36, SEQ ID NO:37, SEQ ID NO:38, SEQ ID NO:39, SEQ ID NO:40, SEQ ID NO:41, SEQ ID NO:65, SEQ ID NO:66, SEQ ID NO:67, SEQ ID NO:68, SEQ ID NO:69, ou SEQ ID NO:70, no qual o polipeptídeo compreende um aminoácido que é um aminoácido polar outro do que K ou R na posição 423, ou o polipeptí-

deo compreende uma anulação na posição 423, conforme determinada com referência à SEQ ID NO:1, e o polipeptídeo tem atividade condrogênica. Em uma concretização adicional, um polipeptídeo tem pelo menos 95% de identidade, ou pelo menos 96%, 97%, 98%, ou 99% de identidade, para uma sequência de aminoácido selecionada de qualquer uma de SEQ ID NO:14, SEQ ID NO:15, SEQ ID NO:16, SEQ ID NO:17, SEQ ID NO:18, SEQ ID NO:19, SEQ ID NO:20, SEQ ID NO:21, SEQ ID NO:22, SEQ ID NO:23, SEQ ID NO:24, SEQ ID NO:25, SEQ ID NO:26, SEQ ID NO:27, SEQ ID NO:28, SEQ ID NO:29, SEQ ID NO:58, SEQ ID NO:59, SEQ ID NO:60, SEQ ID NO:61, SEQ ID NO:62, SEQ ID NO:63, ou SEQ ID NO:64, no qual o polipeptídeo compreende um aminoácido que é um aminoácido polar outro do que K ou R na posição 423, conforme determinada com referência à SEQ ID NO:1, e o polipeptídeo tem atividade condrogênica.

[0047] Em algumas concretizações, um polipeptídeo isolado é uma sequência de aminoácido selecionada de qualquer uma das sequências da TABELA 1. Em algumas concretizações, um polipeptídeo é uma sequência de aminoácido selecionada de qualquer uma de SEQ ID NO:30, SEQ ID NO:31, SEQ ID NO:32, SEQ ID NO:33, SEQ ID NO:34, SEQ ID NO:35, SEQ ID NO:36, SEQ ID NO:37, SEQ ID NO:38, SEQ ID NO:39, SEQ ID NO:40, SEQ ID NO:41, SEQ ID NO:65, SEQ ID NO:66, SEQ ID NO:67, SEQ ID NO:68, SEQ ID NO:69, ou SEQ ID NO:70. Em uma concretização adicional, um polipeptídeo é uma sequência de aminoácido selecionada de qualquer uma de SEQ ID NO:14, SEQ ID NO:15, SEQ ID NO:16, SEQ ID NO:17, SEQ ID NO:19, SEQ ID NO:20, SEQ ID NO:21, SEQ ID NO:22, SEQ ID NO:24, SEQ ID NO:25, SEQ ID NO:26, SEQ ID NO:27, SEQ ID NO:28, SEQ ID NO:29, SEQ ID NO:58, SEQ ID NO:59, SEQ ID NO:60, SEQ ID NO:61, SEQ ID NO:62, SEQ ID NO:63, ou SEQ ID NO:64.

TABELA 1: Construtos variantes de ANGPTL3

SEQ ID	Construto	Sequência
<u>14</u>	<u>207KQ</u>	IQEPTAISLSSKPRAPRTTPFLQLNEIRNVKHDGIPAECTTIYNRGEHTSG MYAIRPSNSQVFHVYCDVISGSPWTLIQHRIDGSQNFNETWENYKYGFG RLDGEFWLGLEKIYSIVKQSNYVLRIELEDWKNKHIEYSFYLGHNHETN YTLHLVAITGNVPNAIPENKDLVFSTWDHKAKGHFNCPGEGYSGGWWWH DECGENNLNGKYNKPRASQSKPERRRGLSWKSQNGRLYSIKSTKMLIHP TDESSEFE
<u>15</u>	<u>207KS</u>	IQEPTAISLSSKPRAPRTTPFLQLNEIRNVKHDGIPAECTTIYNRGEHTSG MYAIRPSNSQVFHVYCDVISGSPWTLIQHRIDGSQNFNETWENYKYGFG RLDGEFWLGLEKIYSIVKQSNYVLRIELEDWKNKHIEYSFYLGHNHETN YTLHLVAITGNVPNAIPENKDLVFSTWDHKAKGHFNCPGEGYSGGWWWH DECGENNLNGKYNKPRASSKPERRRGLSWKSQNGRLYSIKSTKMLIHP TDESSEFE
<u>16</u>	<u>225KQ</u>	TTPFLQLNEIRNVKHDGIPAECTTIYNRGEHTSGMYAIRPSNSQVFHVYC DVISGSPWTLIQHRIDGSQNFNETWENYKYGFGRLDGEFWLGLEKIYSIV KQSNYVLRIELEDWKNKHIEYSFYLGHNHETNYTLHLVAITGNVPNAIPE NKDLVFSTWDHKAKGHFNCPGEGYSGGWWWHDECGENNLNGKYNKPR AQSKEPERRRGLSWKSQNGRLYSIKSTKMLIHPTDESSEFE
<u>17</u>	<u>225KS</u>	TTPFLQLNEIRNVKHDGIPAECTTIYNRGEHTSGMYAIRPSNSQVFHVYC DVISGSPWTLIQHRIDGSQNFNETWENYKYGFGRLDGEFWLGLEKIYSIV KQSNYVLRIELEDWKNKHIEYSFYLGHNHETNYTLHLVAITGNVPNAIPE NKDLVFSTWDHKAKGHFNCPGEGYSGGWWWHDECGENNLNGKYNKPR ASSKPERRRGLSWKSQNGRLYSIKSTKMLIHPTDESSEFE
<u>18</u>	<u>225ST</u>	TTPFLQLNEIRNVKHDGIPAECTTIYNRGEHTSGMYAIRPSNSQVFHVYC DVISGSPWTLIQHRIDGSQNFNETWENYKYGFGRLDGEFWLGLEKIYSIV KQSNYVLRIELEDWKNKHIEYSFYLGHNHETNYTLHLVAITGNVPNAIPE NKDLVFSTWDHKAKGHFNCPGEGYSGGWWWHDECGENNLNGKYNKPR AKTKPERRRGLSWKSQNGRLYSIKSTKMLIHPTDESSEFE
<u>19</u>	<u>226KQ</u>	TPFLQLNEIRNVKHDGIPAECTTIYNRGEHTSGMYAIRPSNSQVFHVYCD VISGSPWTLIQHRIDGSQNFNETWENYKYGFGRLDGEFWLGLEKIYSIVK QSNYVLRIELEDWKNKHIEYSFYLGHNHETNYTLHLVAITGNVPNAIPE NKDLVFSTWDHKAKGHFNCPGEGYSGGWWWHDECGENNLNGKYNKPR AQSKEPERRRGLSWKSQNGRLYSIKSTKMLIHPTDESSEFE
<u>20</u>	<u>226KS</u>	TPFLQLNEIRNVKHDGIPAECTTIYNRGEHTSGMYAIRPSNSQVFHVYCD VISGSPWTLIQHRIDGSQNFNETWENYKYGFGRLDGEFWLGLEKIYSIVK QSNYVLRIELEDWKNKHIEYSFYLGHNHETNYTLHLVAITGNVPNAIPE NKDLVFSTWDHKAKGHFNCPGEGYSGGWWWHDECGENNLNGKYNKPR ASSKPERRRGLSWKSQNGRLYSIKSTKMLIHPTDESSEFE

SEQ ID	Construto	Sequência
<u>21</u>	<u>228KQ</u>	FLQLNEIRNVKHDGIPAECTTIYNRGEHTSGMYAIRPSNSQVFHVYCDVI SGSPWTLIQHRIDGSQNFNETWENYKYGFGRLDGEFWLGLEKIYSIVKQ SNYVLRIELEDWKDNKHIEYSFYLGNETNYTLHLVAITGNVPNAIPENK DLVFSTWDHKAKGHFNCPEGYSGGWWWHDECENNLNGKYNKPRAQ SKPERRRGLSWKSQNGRLYSIKSTKMLIHPTDSESFE
<u>22</u>	<u>228KS</u>	FLQLNEIRNVKHDGIPAECTTIYNRGEHTSGMYAIRPSNSQVFHVYCDVI SGSPWTLIQHRIDGSQNFNETWENYKYGFGRLDGEFWLGLEKIYSIVKQ SNYVLRIELEDWKDNKHIEYSFYLGNETNYTLHLVAITGNVPNAIPENK DLVFSTWDHKAKGHFNCPEGYSGGWWWHDECENNLNGKYNKPRAQ SKPERRRGLSWKSQNGRLYSIKSTKMLIHPTDSESFE
<u>23</u>	<u>228ST</u>	FLQLNEIRNVKHDGIPAECTTIYNRGEHTSGMYAIRPSNSQVFHVYCDVI SGSPWTLIQHRIDGSQNFNETWENYKYGFGRLDGEFWLGLEKIYSIVKQ SNYVLRIELEDWKDNKHIEYSFYLGNETNYTLHLVAITGNVPNAIPENK DLVFSTWDHKAKGHFNCPEGYSGGWWWHDECENNLNGKYNKPRAQ TKPERRRGLSWKSQNGRLYSIKSTKMLIHPTDSESFE
<u>24</u>	<u>233KQ</u>	EIRNVKHDGIPAECTTIYNRGEHTSGMYAIRPSNSQVFHVYCDVISGSPW TLIQHRIDGSQNFNETWENYKYGFGRLDGEFWLGLEKIYSIVKQSNYVLR IELEDWKDNKHIEYSFYLGNETNYTLHLVAITGNVPNAIPENKDLVFST WDHKAKGHFNCPEGYSGGWWWHDECENNLNGKYNKPRAQSKPER RRGLSWKSQNGRLYSIKSTKMLIHPTDSESFE
<u>25</u>	<u>233KS</u>	EIRNVKHDGIPAECTTIYNRGEHTSGMYAIRPSNSQVFHVYCDVISGSPW TLIQHRIDGSQNFNETWENYKYGFGRLDGEFWLGLEKIYSIVKQSNYVLR IELEDWKDNKHIEYSFYLGNETNYTLHLVAITGNVPNAIPENKDLVFST WDHKAKGHFNCPEGYSGGWWWHDECENNLNGKYNKPRAQSKPER RRGLSWKSQNGRLYSIKSTKMLIHPTDSESFE
<u>26</u>	<u>241KQ</u>	GIPAECTTIYNRGEHTSGMYAIRPSNSQVFHVYCDVISGSPWTLIQHRID GSQNFNETWENYKYGFGRLDGEFWLGLEKIYSIVKQSNYVLRIELEDWK DNKHIEYSFYLGNETNYTLHLVAITGNVPNAIPENKDLVFSTWDHKAK GHFNCPEGYSGGWWWHDECENNLNGKYNKPRAQSKPERRRGLSW KSQNGRLYSIKSTKMLIHPTDSESFE
<u>27</u>	<u>241KS</u>	GIPAECTTIYNRGEHTSGMYAIRPSNSQVFHVYCDVISGSPWTLIQHRID GSQNFNETWENYKYGFGRLDGEFWLGLEKIYSIVKQSNYVLRIELEDWK DNKHIEYSFYLGNETNYTLHLVAITGNVPNAIPENKDLVFSTWDHKAK GHFNCPEGYSGGWWWHDECENNLNGKYNKPRAQSKPERRRGLSW KSQNGRLYSIKSTKMLIHPTDSESFE
<u>28</u>	<u>242KQ</u>	IPAECTTIYNRGEHTSGMYAIRPSNSQVFHVYCDVISGSPWTLIQHRIDG SQNFNETWENYKYGFGRLDGEFWLGLEKIYSIVKQSNYVLRIELEDWKD NKHIEYSFYLGNETNYTLHLVAITGNVPNAIPENKDLVFSTWDHKAKG HFNCPEGYSGGWWWHDECENNLNGKYNKPRAQSKPERRRGLSWK SQNGRLYSIKSTKMLIHPTDSESFE

SEQ ID	Construto	Sequência
<u>29</u>	<u>242KS</u>	IPAECTTIYNRGEHTSGMYAIRPSNSQVFHVYCDVISGSPWTLIQHRIDG SQNFNETWENYKYGFGRLDGEFWLGLEKIYSIVKQSNYVLRIELEDWKD NKHYIEYSFYLGHNHETNYTLHLVAITGNVPNAIPENKDLVFSTWDHKAKG HFNCPEGYSGGWWWHDECGENNLNGKYNKPRASSKPERRRGLSWKS QNGRLYSIKSTKMLIHPTDSESFE
<u>30</u>	<u>225- 455KQ</u>	TTPFLQLNEIRNVKHDGIPAECTTIYNRGEHTSGMYAIRPSNSQVFHVYC DVISGSPWTLIQHRIDGSQNFNETWENYKYGFGRLDGEFWLGLEKIYSIV KQSNYVLRIELEDWKDKNKHIEYSFYLGHNHETNYTLHLVAITGNVPNAIPE NKDLVFSTWDHKAKGHFNCPGYSGGWWWHDECGENNLNGKYNKPR AASKPERRRGLSWKSQNGRLYSIKSTKMLIHPTD
<u>31</u>	<u>225- 455KS</u>	TTPFLQLNEIRNVKHDGIPAECTTIYNRGEHTSGMYAIRPSNSQVFHVYC DVISGSPWTLIQHRIDGSQNFNETWENYKYGFGRLDGEFWLGLEKIYSIV KQSNYVLRIELEDWKDKNKHIEYSFYLGHNHETNYTLHLVAITGNVPNAIPE NKDLVFSTWDHKAKGHFNCPGYSGGWWWHDECGENNLNGKYNKPR ASSKPERRRGLSWKSQNGRLYSIKSTKMLIHPTD
<u>32</u>	<u>226- 455KQ</u>	TPFLQLNEIRNVKHDGIPAECTTIYNRGEHTSGMYAIRPSNSQVFHVYCD VISGSPWTLIQHRIDGSQNFNETWENYKYGFGRLDGEFWLGLEKIYSIVK QSNYVLRIELEDWKDKNKHIEYSFYLGHNHETNYTLHLVAITGNVPNAIPE NKDLVFSTWDHKAKGHFNCPGYSGGWWWHDECGENNLNGKYNKPR AASKPERRRGLSWKSQNGRLYSIKSTKMLIHPTD
<u>33</u>	<u>226- 455KS</u>	TPFLQLNEIRNVKHDGIPAECTTIYNRGEHTSGMYAIRPSNSQVFHVYCD VISGSPWTLIQHRIDGSQNFNETWENYKYGFGRLDGEFWLGLEKIYSIVK QSNYVLRIELEDWKDKNKHIEYSFYLGHNHETNYTLHLVAITGNVPNAIPE NKDLVFSTWDHKAKGHFNCPGYSGGWWWHDECGENNLNGKYNKPR ASSKPERRRGLSWKSQNGRLYSIKSTKMLIHPTD
<u>34</u>	<u>228- 455KQ</u>	FLQLNEIRNVKHDGIPAECTTIYNRGEHTSGMYAIRPSNSQVFHVYCDVI SGSPWTLIQHRIDGSQNFNETWENYKYGFGRLDGEFWLGLEKIYSIVKQ SNYVLRIELEDWKDKNKHIEYSFYLGHNHETNYTLHLVAITGNVPNAIPENK DLVFSTWDHKAKGHFNCPGYSGGWWWHDECGENNLNGKYNKPRAS SKPERRRGLSWKSQNGRLYSIKSTKMLIHPTD
<u>35</u>	<u>228- 455KS</u>	FLQLNEIRNVKHDGIPAECTTIYNRGEHTSGMYAIRPSNSQVFHVYCDVI SGSPWTLIQHRIDGSQNFNETWENYKYGFGRLDGEFWLGLEKIYSIVKQ SNYVLRIELEDWKDKNKHIEYSFYLGHNHETNYTLHLVAITGNVPNAIPENK DLVFSTWDHKAKGHFNCPGYSGGWWWHDECGENNLNGKYNKPRAS SKPERRRGLSWKSQNGRLYSIKSTKMLIHPTD
<u>36</u>	<u>233- 455KQ</u>	EIRNVKHDGIPAECTTIYNRGEHTSGMYAIRPSNSQVFHVYCDVISGSPW TLIQHRIDGSQNFNETWENYKYGFGRLDGEFWLGLEKIYSIVKQSNYVLR IELEDWKDKNKHIEYSFYLGHNHETNYTLHLVAITGNVPNAIPENKDLVFST WDHKAKGHFNCPGYSGGWWWHDECGENNLNGKYNKPRASQSKPER RRGLSWKSQNGRLYSIKSTKMLIHPTD

SEQ ID	Construto	Sequência
<u>37</u>	<u>233-455KS</u>	EIRNVKHDGIPAECTTIYNRGEHTSGMYAIRPSNSQVFHVYCDVISGSPW TLIQHRIDGSQNFNETWENYKYGFGRLDGEFWLGLEKIYSIVKQSNYVLR IELEDWKDNKHIEYSFYLGNETNYTLHLVAITGNVPNAIPENKDLVFST WDHKAKGHFNCPEGYSGGWWWHDECENNLNGKYNKPRASSKPER RRGLSWKSQNGRLYSIKSTKMLIHPTD
<u>38</u>	<u>241-455KQ</u>	GIPAECTTIYNRGEHTSGMYAIRPSNSQVFHVYCDVISGSPWTLIQHRID GSQNFNETWENYKYGFGRLDGEFWLGLEKIYSIVKQSNYVLRIELEDWK DNKHIEYSFYLGNETNYTLHLVAITGNVPNAIPENKDLVFSTWDHKAK GHFNCPEGYSGGWWWHDECENNLNGKYNKPRASQKPERRRGLSW KSQNGRLYSIKSTKMLIHPTD
<u>39</u>	<u>241-455KS</u>	GIPAECTTIYNRGEHTSGMYAIRPSNSQVFHVYCDVISGSPWTLIQHRID GSQNFNETWENYKYGFGRLDGEFWLGLEKIYSIVKQSNYVLRIELEDWK DNKHIEYSFYLGNETNYTLHLVAITGNVPNAIPENKDLVFSTWDHKAK GHFNCPEGYSGGWWWHDECENNLNGKYNKPRASSKPERRRGLSW KSQNGRLYSIKSTKMLIHPTD
<u>40</u>	<u>242-455KQ</u>	IPAECTTIYNRGEHTSGMYAIRPSNSQVFHVYCDVISGSPWTLIQHRIDG SQNFNETWENYKYGFGRLDGEFWLGLEKIYSIVKQSNYVLRIELEDWKD NKHYIEYSFYLGNETNYTLHLVAITGNVPNAIPENKDLVFSTWDHKAKG HFNCPEGYSGGWWWHDECENNLNGKYNKPRASQKPERRRGLSWK SQNGRLYSIKSTKMLIHPTD
<u>41</u>	<u>242-455KS</u>	IPAECTTIYNRGEHTSGMYAIRPSNSQVFHVYCDVISGSPWTLIQHRIDG SQNFNETWENYKYGFGRLDGEFWLGLEKIYSIVKQSNYVLRIELEDWKD NKHYIEYSFYLGNETNYTLHLVAITGNVPNAIPENKDLVFSTWDHKAKG HFNCPEGYSGGWWWHDECENNLNGKYNKPRASSKPERRRGLSWKS QNGRLYSIKSTKMLIHPTD
<u>58</u>	<u>207Kdel</u>	IQEPTAISLSSKPRAPRTTFFLQNEIRNVKHDGIPAECTTIYNRGEHTSG MYAIRPSNSQVFHVYCDVISGSPWTLIQHRIDGSQNFNETWENYKYGFG RLDGEFWLGLEKIYSIVKQSNYVLRIELEDWKDNKHIEYSFYLGNETN YTLHLVAITGNVPNAIPENKDLVFSTWDHKAKGHFNCPEGYSGGWWWH DECENNLNGKYNKPRASKPERRRGLSWKSQNGRLYSIKSTKMLIHPT DSESEFE
<u>59</u>	<u>225Kdel</u>	TTPFLQNEIRNVKHDGIPAECTTIYNRGEHTSGMYAIRPSNSQVFHVYC DVISGSPWTLIQHRIDGSQNFNETWENYKYGFGRLDGEFWLGLEKIYSIV KQSNYVLRIELEDWKDNKHIEYSFYLGNETNYTLHLVAITGNVPNAIPE NKDLVFSTWDHKAKGHFNCPEGYSGGWWWHDECENNLNGKYNKPR ASKPERRRGLSWKSQNGRLYSIKSTKMLIHPTDSESEFE
<u>60</u>	<u>226Kdel</u>	TPFLQNEIRNVKHDGIPAECTTIYNRGEHTSGMYAIRPSNSQVFHVYCD VISGSPWTLIQHRIDGSQNFNETWENYKYGFGRLDGEFWLGLEKIYSIVK QSNYVLRIELEDWKDNKHIEYSFYLGNETNYTLHLVAITGNVPNAIPE NKDLVFSTWDHKAKGHFNCPEGYSGGWWWHDECENNLNGKYNKPR ASKPERRRGLSWKSQNGRLYSIKSTKMLIHPTDSESEFE

<u>SEQ ID</u>	<u>Construto</u>	<u>Sequência</u>
<u>61</u>	<u>228Kdel</u>	FLQLNEIRNVKHDGIPAECTTIYNRGEHTSGMYAIRPSNSQVFHVYCDVI SGSPWTLIQHRIDGSQNFNETWENYKYGFGRLDGEFWLGLEKIYSIVKQ SNYVLRIELEDWKDNKHIEYSFYLGNETNYTLHLVAITGNVPNAIPENK DLVFSTWDHKAKGHFNCPEGYSGGWWWHDECENNLNGKYNKPRAS KPERRRGLSWKSQNGRLYSIKSTKMLIHPTDSESEFE
<u>62</u>	<u>233Kdel</u>	EIRNVKHDGIPAECTTIYNRGEHTSGMYAIRPSNSQVFHVYCDVISGSPW TLIQHRIDGSQNFNETWENYKYGFGRLDGEFWLGLEKIYSIVKQSNYVLR IELEDWKDNKHIEYSFYLGNETNYTLHLVAITGNVPNAIPENKDLVFST WDHKAKGHFNCPEGYSGGWWWHDECENNLNGKYNKPRASKPERR RGLSWKSQNGRLYSIKSTKMLIHPTDSESEFE
<u>63</u>	<u>241Kdel</u>	GIPAECTTIYNRGEHTSGMYAIRPSNSQVFHVYCDVISGSPWTLIQHRID GSQNFNETWENYKYGFGRLDGEFWLGLEKIYSIVKQSNYVLRIELEDWK DNKHIEYSFYLGNETNYTLHLVAITGNVPNAIPENKDLVFSTWDHKAK GHFNCPEGYSGGWWWHDECENNLNGKYNKPRASKPERRRGLSWK SQNGRLYSIKSTKMLIHPTDSESEFE
<u>64</u>	<u>242Kdel</u>	IPAECTTIYNRGEHTSGMYAIRPSNSQVFHVYCDVISGSPWTLIQHRIDG SQNFNETWENYKYGFGRLDGEFWLGLEKIYSIVKQSNYVLRIELEDWKD NKHIEYSFYLGNETNYTLHLVAITGNVPNAIPENKDLVFSTWDHKAKG HFNCPEGYSGGWWWHDECENNLNGKYNKPRASKPERRRGLSWKS QNGRLYSIKSTKMLIHPTDSESEFE
<u>65</u>	<u>225- 455Kdel</u>	TTPFLQLNEIRNVKHDGIPAECTTIYNRGEHTSGMYAIRPSNSQVFHVYC DVISGSPWTLIQHRIDGSQNFNETWENYKYGFGRLDGEFWLGLEKIYSIV KQSNYVLRIELEDWKDNKHIEYSFYLGNETNYTLHLVAITGNVPNAIPE NKDLVFSTWDHKAKGHFNCPEGYSGGWWWHDECENNLNGKYNKPR ASKPERRRGLSWKSQNGRLYSIKSTKMLIHPTD
<u>66</u>	<u>226- 455Kdel</u>	TPFLQLNEIRNVKHDGIPAECTTIYNRGEHTSGMYAIRPSNSQVFHVYCD VISGSPWTLIQHRIDGSQNFNETWENYKYGFGRLDGEFWLGLEKIYSIVK QSNYVLRIELEDWKDNKHIEYSFYLGNETNYTLHLVAITGNVPNAIPE NKDLVFSTWDHKAKGHFNCPEGYSGGWWWHDECENNLNGKYNKPR ASKPERRRGLSWKSQNGRLYSIKSTKMLIHPTD
<u>67</u>	<u>228- 455Kdel</u>	FLQLNEIRNVKHDGIPAECTTIYNRGEHTSGMYAIRPSNSQVFHVYCDVI SGSPWTLIQHRIDGSQNFNETWENYKYGFGRLDGEFWLGLEKIYSIVKQ SNYVLRIELEDWKDNKHIEYSFYLGNETNYTLHLVAITGNVPNAIPENK DLVFSTWDHKAKGHFNCPEGYSGGWWWHDECENNLNGKYNKPRAS KPERRRGLSWKSQNGRLYSIKSTKMLIHPTD
<u>68</u>	<u>233- 455Kdel</u>	EIRNVKHDGIPAECTTIYNRGEHTSGMYAIRPSNSQVFHVYCDVISGSPW TLIQHRIDGSQNFNETWENYKYGFGRLDGEFWLGLEKIYSIVKQSNYVLR IELEDWKDNKHIEYSFYLGNETNYTLHLVAITGNVPNAIPENKDLVFST WDHKAKGHFNCPEGYSGGWWWHDECENNLNGKYNKPRASKPERR RGLSWKSQNGRLYSIKSTKMLIHPTD

<u>SEQ ID</u>	<u>Construto</u>	<u>Sequência</u>
<u>69</u>	<u>241-455Kdel</u>	GIPAECTTIYNRGEHTSGMYAIRPSNSQVFHVYCDVISGSPWTLIQHRID GSQNFNETWENYKYGFGRLDGEFWLGLEKIYSIVKQSNYVLRIELEDWK DNKHIEYSFYLGNHETNYTLHLVAITGNVPNAIPENKDLVFSTWDHKAK GHFNCPEGYSGGWWWHDECGENNLNGKYNKPRASKPERRRGLSWK SQNGRLYSIKSTKMLIHPTD
<u>70</u>	<u>242-455Kdel</u>	IPAECTTIYNRGEHTSGMYAIRPSNSQVFHVYCDVISGSPWTLIQHRIDG SQNFNETWENYKYGFGRLDGEFWLGLEKIYSIVKQSNYVLRIELEDWKD NKHIEYSFYLGNHETNYTLHLVAITGNVPNAIPENKDLVFSTWDHKAKG HFNCPEGYSGGWWWHDECGENNLNGKYNKPRASKPERRRGLSWKS QNGRLYSIKSTKMLIHPTD

[0048] Os polipeptídeos de ANGPTL3 modificados da invenção têm pelo menos uma substituição na porção C-terminal do polipeptídeo para tornar o polipeptídeo resistente à protease. A substituição é em um resíduo R ou K, de modo que os polipeptídeos aumentam a resistência, por exemplo, para proteases similares à tripsina. Qualquer aminoácido pode ser substituído por um R ou K em um polipeptídeo de ANGPTL3 resistente à protease da invenção. Em algumas concretizações, uma substituição é um aminoácido polar, por exemplo, H, N, Q, S, T, A, ou Y. Em algumas concretizações, uma substituição é H, N, Q, S, T, ou Y. Em algumas concretizações, uma substituição é S ou Q. Em algumas concretizações, a substituição é Q. Em algumas concretizações, a substituição é S. Em algumas concretizações, um peptídeo resistente à protease tem um aminoácido na posição 423, com referência à SEQ ID NO:1, que é outro do que K ou R. Em algumas concretizações, um polipeptídeo da invenção compreende um aminoácido na posição 423 que é um aminoácido polar. Por exemplo, o aminoácido na posição 423 pode ser Q ou S, ou outro aminoácido polar. Em certas concretizações, um polipeptídeo da invenção tem um Q na posição 423. Em outras concretizações, um polipeptídeo da invenção tem um S na posição 423. Em algumas concretizações, em adição à substituição em 423, o peptídeo resistente à protease tem uma substituição de outro R ou K na C-terminal de SEQ ID NO:1, ou uma variante desta, no qual a substituição é um aminoácido polar outro do que R

ou K. Em algumas concretizações, a substituição na posição 423, conforme determinada com referência à SEQ ID NO:1, é Q ou S. Em ainda outras concretizações, um polipeptídeo da invenção tem uma anulação na posição 423, conforme determinada com referência à SEQ ID NO:1.

[0049] Em algumas concretizações, um polipeptídeo da invenção é 250 aminoácidos ou menos de comprimento, e compreende a sequência de aminoácido de SEQ ID NO:16, SEQ ID NO:19, SEQ ID NO:20, SEQ ID NO:21, SEQ ID NO:22, SEQ ID NO:24, SEQ ID NO:25, SEQ ID NO:26, SEQ ID NO:27, SEQ ID NO:28, SEQ ID NO:29, SEQ ID NO:59, SEQ ID NO:60, SEQ ID NO:61, SEQ ID NO:62, SEQ ID NO:63, SEQ ID NO:64, SEQ ID NO:65, SEQ ID NO:66, SEQ ID NO:67, SEQ ID NO:68, SEQ ID NO:69, ou SEQ ID NO:70.

[0050] Em algumas concretizações, a invenção proporciona uso de proteínas de ANGPTL3 condrogênica resistente à protease de comprimento total. Em algumas concretizações, a invenção proporciona proteínas de ANGPTL3 resistente à protease compreendendo uma porção C-terminal da sequência de ANGPTL3, ou uma variante condrogênica destas. Em certas concretizações, as proteínas de ANGPTL3 carecem da extremidade amino-terminal da proteína nativa. Em algumas concretizações, as proteínas de ANGPTL3 resistentes à protease da invenção carecem de domínio de CCD e/ou carecem de atividade significativa de CCD. Desse modo, em algumas concretizações, as proteínas de ANGPTL3 resistentes à protease da invenção compreendem pelo menos um fragmento (por exemplo, pelo menos 100, 150, 200, 220 ou 215 aminoácidos contíguos) de um domínio carbóxi-terminal de proteína de ANGPTL3 humana, ou uma sequência substancialmente idêntica para a sequência de proteína de ANGPTL3 carbóxi-terminal humana, no qual o polipeptídeo e variantes deste retêm atividade condrogênica. Em algumas concretizações, um polipeptídeo

resistente à protease da invenção carece pelo menos de uma porção da sequência C-terminal, por exemplo, carece de 5, 10, 15, ou 20 aminoácidos a partir da extremidade C-terminal de SEQ ID NO:1 (isto é, carece de 456-460, 451-460, 446-460 ou 441-460 de SEQ ID NO:1).

[0051] Em algumas concretizações, um polipeptídeo de ANGPTL3 resistente à protease da invenção compreende aminoácidos contíguos correspondentes às regiões de aminoácido: aminoácidos 241-455, ou 241-460 de SEQ ID NO:1; aminoácidos 242-455, ou 242-460 de SEQ ID NO:1; aminoácidos 233-455 ou 233-460 de SEQ ID NO:1; aminoácidos 228-455 ou 228-460 de SEQ ID NO:1, aminoácidos 226-455- ou 226-260 ou aminoácidos 225-455- ou 225-260 de SEQ ID NO:1, em que um aminoácido é substituído por um R ou K, ou um resíduo único é anulado. Em algumas concretizações, uma substituição está na posição 423, conforme determinada com referência à SEQ ID NO:1. Em algumas concretizações, uma anulação está na posição 423, conforme determinada com referência à SEQ ID NO:1. Em algumas concretizações, um polipeptídeo resistente à protease compreende aminoácidos contíguos correspondentes às regiões de aminoácido 207-455 ou 207-460 de SEQ ID NO:1, em que um aminoácido é substituído por R ou K, ou um resíduo único é anulado. Em algumas concretizações, uma substituição ou anulação está na posição 423. Em algumas concretizações, uma substituição é um aminoácido polar, por exemplo, H, N, Q, S, T, A, ou Y. Em algumas concretizações, uma substituição é H, N, Q, S, T, ou Y. Em algumas concretizações, uma substituição é S ou Q. Em algumas concretizações, uma substituição é Q. Em certas concretizações, uma anulação na posição 423 relativa a SEQ ID NO:1 é incluída.

[0052] A invenção adicionalmente proporciona um polipeptídeo resistente à protease, no qual o polipeptídeo compreende uma sequência de aminoácido tendo pelo menos 95% de identidade, ou pelo

menos 96%, 97%, 98%, ou 99% de identidade, para aminoácidos 240-454 de SEQ ID NO:1, aminoácidos 241-455 de SEQ ID NO:1, ou aminoácidos 242-455 de SEQ ID NO:1 com uma substituição ou anulação no aminoácido correspondente à posição 423 de SEQ ID NO:1, onde o aminoácido substituído não é R, e no qual o polipeptídeo tem atividade condrogênica. Em outras concretizações, o polipeptídeo compreende aminoácidos 240-454 de SEQ ID NO:1, aminoácidos 241-455 de SEQ ID NO:1, ou aminoácidos 242-455 de SEQ ID NO:1, cada polipeptídeo com uma substituição ou anulação no aminoácido correspondente à posição 423 de SEQ ID NO:1, onde o aminoácido substituído é Q ou S.

[0053] Em algumas concretizações, um polipeptídeo de ANGPTL3 resistente à protease da invenção compreende uma sequência de aminoácido tendo pelo menos 95%, ou pelo menos 96%, pelo menos 97%, pelo menos 98%, ou pelo menos 99% de identidade para aminoácidos 242-455 ou 242-460 de SEQ ID NO:1; 241-455 ou 241-460 de SEQ ID NO:1; aminoácidos 233-455 ou 233-460 de SEQ ID NO:1; aminoácidos 228-455 ou 228-460 de SEQ ID NO:1, aminoácidos 226-455- ou 226-260 de SEQ ID NO:1, ou aminoácidos 225-455- ou 225-260 de SEQ ID NO:1 em que um aminoácido é substituído por um R ou K, ou um R ou K é anulado. Em algumas concretizações, a substituição ou anulação está na posição 423. Em algumas concretizações, uma substituição é um aminoácido polar, por exemplo, H, N, Q, S, T, A, ou Y. Em algumas concretizações, uma substituição é H, N, Q, S, T, ou Y. Em algumas concretizações, a substituição é S ou Q. Em algumas concretizações, a substituição é a Q. Em certas concretizações, existe um resíduo anulado na posição 423 relativa a SEQ ID NO:1.

[0054] Em algumas concretizações, um polipeptídeo de ANGPTL3 resistente à protease da invenção é 250 ou 240 ou menos aminoácidos de comprimento, e compreende a sequência de aminoácido de

SEQ ID NO:16, SEQ ID NO:19, SEQ ID NO:20, SEQ ID NO:21, SEQ ID NO:22, SEQ ID NO:24, SEQ ID NO:25, SEQ ID NO:26, SEQ ID NO:27, SEQ ID NO:28, SEQ ID NO:29, SEQ ID NO:30, SEQ ID NO:31, SEQ ID NO:32, SEQ ID NO:33, SEQ ID NO:34, SEQ ID NO:35, SEQ ID NO:36, SEQ ID NO:37, SEQ ID NO:38, SEQ ID NO:39, SEQ ID NO:40, SEQ ID NO:41, SEQ ID NO:59, SEQ ID NO:60, SEQ ID NO:61, SEQ ID NO:62, SEQ ID NO:63, SEQ ID NO:64, SEQ ID NO:65, SEQ ID NO:66, SEQ ID NO:67, SEQ ID NO:68, SEQ ID NO:69, e SEQ ID NO:70. Em algumas concretizações, um polipeptídeo de ANGPTL3 resistente à protease da invenção é 230 ou 225 ou menos aminoácidos de comprimento, e compreende a sequência de aminoácido de SEQ ID NO:24, SEQ ID NO:25, SEQ ID NO:26, SEQ ID NO:27, SEQ ID NO:28, SEQ ID NO:29, SEQ ID NO:36, SEQ ID NO:37, SEQ ID NO:38, SEQ ID NO:39, SEQ ID NO:40, SEQ ID NO:41, SEQ ID NO:62, SEQ ID NO:63, SEQ ID NO:64, SEQ ID NO:68, SEQ ID NO:69, ou SEQ ID NO:70.

[0055] Em algumas concretizações, as proteínas de ANGPTL3 resistentes à protease da invenção compreendem uma sequência de aminoácido tendo pelo menos 95% de identidade, ou pelo menos 96%, 97%, 98%, ou 99% de identidade, para a sequência de proteína de ANGPTL3 C-terminal canina, bovina, ou equina. Em algumas concretizações, as proteínas de ANGPTL3 resistentes à protease da invenção compreendem pelo menos um fragmento (por exemplo, pelo menos 100, 150, 200, 215 aminoácidos contíguos) de uma sequência de proteína de ANGPTL3 nativa canina (SEQ ID NO:4), equina (SEQ ID NO:5), ou bovina (SEQ ID NO:6)e, ou uma sequência substancialmente idêntica para a sequência de proteína de ANGPTL3 nativa canina, bovina, ou equina no qual o polipeptídeo compreende um aminoácido que é um aminoácido polar outro do que K ou R na posição 423, ou o polipeptídeo compreende uma anulação na posição 423, conforme de-

terminada com referência à SEQ ID NO:1, e o polipeptídeo tem atividade condrogênica. Em algumas concretizações, um polipeptídeo isolado compreende uma sequência de aminoácido tendo pelo menos 95% de identidade, ou pelo menos 96%, 97%, 98%, ou 99% de identidade, para SEQ ID NO:42 ou SEQ ID NO:43, no qual o polipeptídeo compreende um aminoácido que é um aminoácido polar outro do que K ou R na posição 423, ou o polipeptídeo compreende uma anulação na posição 423, conforme determinada com referência à SEQ ID NO:1, e o polipeptídeo tem atividade condrogênica. Em algumas concretizações, um polipeptídeo tem pelo menos 95% de identidade, ou pelo menos 96%, 97%, 98%, ou 99% de identidade, para SEQ ID NO:42, ou SEQ ID NO:43, no qual o polipeptídeo compreende um aminoácido que é um aminoácido polar outro do que K ou R na posição 423, ou o polipeptídeo compreende uma anulação na posição 423, conforme determinada com referência à SEQ ID NO:1, e o polipeptídeo tem atividade condrogênica. Em certas concretizações, um polipeptídeo compreende SEQ ID NO:42, ou SEQ ID NO:43. Em uma concretização adicional, um polipeptídeo é SEQ ID NO:42, ou SEQ ID NO:43.

[0056] Em algumas concretizações, uma ANGPTL3 resistente à protease da invenção compreende uma sequência de aminoácido que tem pelo menos 95%, ou pelo menos 96%, 97%, 98%, ou pelo menos 99% de identidade para aminoácidos 232-454 de SEQ ID NO:4, aminoácidos 240-454 de SEQ ID NO:4, aminoácidos 227-454 de SEQ ID NO:4, ou aminoácidos 224-454 de SEQ ID NO:4, em que um aminoácido é substituído por um R ou K, ou existe uma anulação de um R ou K. Em algumas concretizações, a substituição ou anulação está na posição 422 de SEQ ID NO:4, que corresponde à posição 423 de SEQ ID NO:1. Em algumas concretizações, uma substituição é um aminoácido polar, por exemplo, H, N, Q, S, T, A, ou Y. Em algumas concretizações,

uma substituição é H, N, Q, S, T, ou Y. Em algumas concretizações, a substituição é S ou Q. Em algumas concretizações, a substituição é a Q. Em algumas concretizações, uma anulação de aminoácido está na posição 422 de SEQ ID NO:4.

[0057] Em algumas concretizações, uma ANGPTL3 resistente à protease da invenção compreende uma sequência de aminoácido que tem pelo menos 95%, ou pelo menos 96%, 97%, 98%, ou pelo menos 99% de identidade para aminoácidos 233-455 de SEQ ID NO:5, aminoácidos 241-455 de SEQ ID NO:5, aminoácidos 228-455 de SEQ ID NO:5, ou aminoácidos 225-455 de SEQ ID NO:5, em que um aminoácido é substituído por um R ou K, ou existe uma anulação de um R ou K. Em algumas concretizações, a substituição ou anulação está na posição 423 de SEQ ID NO:5, que corresponde à posição 423 de SEQ ID NO:1. Em algumas concretizações, uma substituição é um aminoácido polar, por exemplo, H, N, Q, S, T, A, ou Y. Em algumas concretizações, uma substituição é H, N, Q, S, T, ou Y. Em algumas concretizações, a substituição é S ou Q. Em algumas concretizações, a substituição é a Q. Em algumas concretizações, uma anulação de aminoácido está na posição 423 de SEQ ID NO:5.

[0058] Em algumas concretizações, uma ANGPTL3 resistente à protease da invenção compreende uma sequência de aminoácido que tem pelo menos 95%, ou pelo menos 96%, 97%, 98%, ou pelo menos 99% de identidade para aminoácidos 233-455 de SEQ ID NO:6, aminoácidos 241-455 de SEQ ID NO:6, aminoácidos 228-455 de SEQ ID NO:6, ou aminoácidos 225-455 de SEQ ID NO:6, em que um aminoácido é substituído por um R ou K, ou existe uma anulação de um R ou K. Em algumas concretizações, a substituição ou anulação está na posição 422 de SEQ ID NO:6, que corresponde à posição 423 de SEQ ID NO:1. Em algumas concretizações, uma substituição é um aminoácido polar, por exemplo, H, N, Q, S, T, A, ou Y. Em algumas concretizações,

uma substituição é H, N, Q, S, T, ou Y. Em algumas concretizações, a substituição é S ou Q. Em algumas concretizações, a substituição é um Q. Em algumas concretizações, uma anulação de aminoácido está na posição 422 de SEQ ID NO:6.

[0059] Em algumas concretizações, um polipeptídeo de ANGPTL3 resistente à protease da invenção compreende aminoácidos contíguos correspondentes às regiões de aminoácido: aminoácidos 240-454 de SEQ ID NO:4; aminoácidos 232-454 de SEQ ID NO:4; aminoácidos 227-454 de SEQ ID NO:4, ou aminoácidos 224-454 de SEQ ID NO:4, em que um aminoácido é substituído por um R ou K, ou existe uma anulação de um R ou K. Em algumas concretizações, a substituição ou anulação está na posição 422 de SEQ ID NO:4 (que é posição 423, conforme determinada com referência à SEQ ID NO:1). Em algumas concretizações, uma substituição é um aminoácido polar, por exemplo, H, N, Q, S, T, A, ou Y. Em algumas concretizações, uma substituição é H, N, Q, S, T, ou Y. Em algumas concretizações, a substituição é S ou Q. Em algumas concretizações, a substituição é Q. Em algumas concretizações, uma anulação de aminoácido está na posição 422 de SEQ ID NO:4.

[0060] Em algumas concretizações, um polipeptídeo de ANGPTL3 resistente à protease da invenção compreende aminoácidos contíguos correspondentes às regiões de aminoácido: aminoácidos 241-455 de SEQ ID NO:5; aminoácidos 233-455 de SEQ ID NO:5; aminoácidos 228-455 de SEQ ID NO:5, ou aminoácidos 225-455 de SEQ ID NO:5, em que um aminoácido é substituído por um R ou K, ou existe uma anulação de um R ou K. Em algumas concretizações, a substituição ou anulação está na posição 423 (que corresponde à posição 423, conforme determinada com referência à SEQ ID NO:1). Em algumas concretizações, uma substituição é um aminoácido polar, por exemplo, H, N, Q, S, T, A, ou Y. Em algumas concretizações, uma substituição é H,

N, Q, S, T, ou Y. Em algumas concretizações, a substituição é S ou Q. Em algumas concretizações, a substituição é Q. Em algumas concretizações, uma anulação de aminoácido está na posição 423 de SEQ ID NO:5.

[0061] Em algumas concretizações, um polipeptídeo de ANGPTL3 resistente à protease da invenção compreende aminoácidos contíguos correspondentes às regiões de aminoácido: aminoácidos 241-455 de SEQ ID NO:6; aminoácidos 233-455 de SEQ ID NO:6; aminoácidos 228-455 de SEQ ID NO:6, ou aminoácidos 225-455 de SEQ ID NO:6, em que um aminoácido é substituído por um R ou K, ou existe uma anulação de um R ou K. Em algumas concretizações, a substituição ou anulação está na posição 422 de SEQ ID NO:6 (que é posição 423, conforme determinada com referência à SEQ ID NO:1). Em algumas concretizações, uma substituição é um aminoácido polar, por exemplo, H, N, Q, S, T, A, ou Y. Em algumas concretizações, uma substituição é H, N, Q, S, T, ou Y. Em algumas concretizações, a substituição é S ou Q. Em algumas concretizações, a substituição é Q. Em algumas concretizações, existe uma anulação na posição 422 de SEQ ID NO:6.

[0062] As proteínas de ANGPTL3 da invenção, conforme descrito acima, podem incluir sequências de proteína de ANGPTL3 nativas que flanqueiam as regiões descritas acima. Alternativamente, em algumas concretizações, as proteínas de ANGPTL3 da invenção podem incluir sequências de flanqueamento de proteína de ANGPTL3 não nativas. Por exemplo, a porção ativa condrogênica de uma proteína de ANGPTL3 pode ser fundida a um ou mais padrões de fusão e/ou aminoácidos heterólogos para formar uma proteína de fusão. As sequências de padrão de fusão podem incluir, mas não limitadas a, etiquetas de aminoácido, não L (por exemplo, D-) aminoácidos, ou outros aminoácido miméticos para prolongar meia-vida *in vivo* e/ou resistência á protease, sequências alvos, ou outras sequências.

[0063] Em algumas concretizações, um polipeptídeo da invenção é PEGilado. Em algumas concretizações, um polipeptídeo da invenção é fundido a um peptídeo heterólogo. Em certas concretizações, um polipeptídeo é fundido a qualquer um de albumina do soro humano (HSA), uma região constante de cadeia pesada de imunoglobulina (Fc), uma poli-histidina, uma glutathione S transferase (GST), uma tioredoxina, uma proteína A, uma proteína G, uma proteína de ligação de maltose (MBP), ou um fragmento de qualquer do(s) polipeptídeo(s) heterólogo(s) precedente(s). Em concretizações particulares, um polipeptídeo heterólogo é fundido na extremidade amino-terminal do polipeptídeo da invenção. Em concretizações adicionais ou alternativas, um polipeptídeo heterólogo é fundido na extremidade carbóxi-terminal do polipeptídeo da invenção.

[0064] As proteínas de ANGPTL3 da invenção têm atividade condrogênica, e são resistentes à protease. Conforme aqui definido, condrogênese ou atividade condrogênica se refere ao desenvolvimento de condrócitos de MSCs. Os indicadores de atividade condrogênica incluem, mas não são limitados a, produção de matriz de cartilagem. A produção de matriz de cartilagem pode ser medida por vários marcadores, por exemplo, tais como Sox9, colágeno tipo II, ou produção de glicosaminoglicano (GAG). Em algumas concretizações, a produção de GAG é medida como um marcador para produção de matriz de cartilagem. Em algumas concretizações, um aumento de 3 vezes na produção de GAG com expressão de proteína específica de cartilagem indica produção positiva de matriz de cartilagem.

[0065] Um polipeptídeo pode ser avaliado para resistência à protease usando qualquer ensaio conhecido que mede a clivagem por uma serina protease, tal como tripsina. Em algumas concretizações, a protease empregada para avaliar a susceptibilidade de proteólise é a serina protease tripsina. Um polipeptídeo é considerado ser resistente

à protease se ele tem sensibilidade reduzida para tripsina quando comparado a sua contraparte tipo selvagem. Um exemplo de um ensaio é medir a quantidade de produto clivado que é gerada quando um polipeptídeo é exposto a tripsina por um período de tempo em comparação a um pepitídeo humano nativo correspondente. A clivagem pode ser medida usando qualquer ensaio conhecido, por exemplo, SDS PAGE ou LCMS. Um ensaio ilustrativo é proporcionado na seção de Exemplos.

[0066] Em um ensaio ilustrativo, proteólise limitada por tripsinólise é realizada por incubação de 10 ng da proteína a ser avaliada com tripsina a razão de massa de 8000:1 (Proteína:Tripsina) por 1 hora à temperatura ambiente. A reação de tripsinólise pode, em seguida, ser suprimida por adição de ácido acético para trazer a reação a pH 3,0. As amostras suprimidas são, em seguida, separada e analisada por SDS-PAGE, por exemplo, em 4-12% de gel Tris-Bis para identificar proteínas que são resistentes a clivagem daquelas que são clivadas pelo aparecimento de um fragmento que é gerado por clivagem de tripsina. O produto de clivagem é ausente ou reduzido nos polipeptídeos resistentes à protease em comparação às suas contrapartes tipo selvagem.

[0067] Em algumas concretizações, o polipeptídeo de ANGPTL3s da invenção compreenderá pelo menos um aminoácido codificado não naturalmente. Em algumas concretizações, um polipeptídeo compreende 1, 2, 3, 4, ou mais aminoácidos não naturais. Métodos de produção e introdução de um aminoácido que ocorre não naturalmente em uma proteína, são conhecidos. Ver, por exemplo, Patente dos Estados Unidos Nos. 7.083.970; e 7.524.647. Os princípios gerais para a produção de sistemas de translação ortogonal que são adequados para produção de proteínas que compreendem um ou mais aminoácido não natural desejados são conhecidos na técnica, como são os métodos

gerais para produção de sistemas de translação ortogonal. Por exemplo, ver Publicações Internacionais Números WO 2002/086075, intitulado "MÉTODOS E COMPOSIÇÃO PARA A PRODUÇÃO DE PARES ORTOGONAIS DE tRNA-AMINOACIL-tRNA;" WO 2002/085923, intitulado "INCORPORAÇÃO *IN VIVO* DE AMINOÁCIDOS NÃO NATURAIS"; WO 2004/094593, intitulado "EXPANSÃO DE CÓDIGO GENÉTICO EUCARIÓTICO"; WO 2005/019415, depositada em 7 de julho de 2004; WO 2005/007870, depositado em 7 de julho de 2004; WO 2005/007624, depositado em 7 de julho de 2004; WO 2006/110182, depositado em 27 de outubro de 2005, intitulado "COMPONENTES DE TRANSLAÇÃO ORTOGONAL PARA INCORPORAÇÃO *IN VIVO* DE AMINOÁCIDOS NÃO NATURAIS", e WO 2007/103490, depositado em 7 de março de 2007, intitulado "SISTEMAS PARA A EXPRESSÃO DE COMPONENTES DE TRANSLAÇÃO ORTOGONAL EM CÉLULAS HOSPEDEIRAS EUROBACTERIAIS". Para discussão de sistemas de translação ortogonal que incorporam aminoácidos não naturais, e métodos para sua produção e uso, ver também, Wang and Schultz, (2005) "Expanding the Genetic Code." *Angewandte Chemie Int Ed* 44: 34-66; Xie e Schultz, (2005) "An Expanding Genetic Code". *Methods* 36: 227-238; Xie and Schultz, (2005) "Adding Amino acids to the Genetic Repertoire". *Curr Opin in Chemical Biology* 9: 548-554; e Wang, et al., (2006) "Expanding the Genetic Code." *Annu Rev Biophys Biomol Struct* 35: 225-249; Deiters, et al, (2005) "*In vivo* incorporation of an alkyne into proteins in *Escherichia coli*". *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 15:1521-1524; Chin, et al., (2002) "Addition of p-Azido-L-phenylalanine to the Genetic Code of *Escherichia coli*." *J Am Chem Soc* 124: 9026-9027; e Publicação Internacional No. WO2006/034332, depositada em 20 de setembro de 2005. Detalhes adicionais são encontrados nas Patentes dos Estados Unidos No. 7.045.337; No. 7.083.970; No. 7.238.510; No. 7.129.333; No.

7.262.040; No. 7.183.082; No. 7.199.222; e No. 7.217.809.

[0068] Um "aminoácido codificado não naturalmente" se refere a um aminoácido que não é um dos aminoácidos comuns ou pirrolisina, pirrolina-carbóxi-lisina, ou selenocisteína. Outros termos que podem ser usados sinonimamente com o termo "aminoácido codificado não naturalmente" são "aminoácido não naturais," "aminoácido não natural," "aminoácido que ocorre não naturalmente," e versões diversamente hifenizadas e não hifenizadas destes. O termo "aminoácido codificado não naturalmente" também inclui, mas não é limitado a, aminoácidos que ocorrem por modificação (por exemplo, modificações pós-translacionais) de um aminoácido codificado naturalmente (incluindo, mas não limitado a, os 20 aminoácidos comuns ou pirrolisina, pirrolina-carbóxi-lisina, e selenocisteína), mas não são por si naturalmente incorporados em uma cadeia de polipeptídeo em crescimento pelo complexo de translação. Exemplos de tais aminoácidos que ocorrem não naturalmente incluem, mas não são limitados a, N-acetilglucosaminil-L-serina, N-acetilglucosaminil-L-treonina, e O-fosfotirosina.

[0069] Um aminoácido codificado não naturalmente é tipicamente qualquer estrutura tendo qualquer cadeia lateral substituinte outra do que uma usada nos vinte aminoácidos naturais. Devido aos aminoácidos codificados não naturalmente da invenção tipicamente diferirem dos aminoácidos naturais somente na estrutura da cadeia lateral, os aminoácidos codificados não naturalmente formam ligações de amida com outros aminoácidos, incluindo, mas não limitado a, natural ou não naturalmente codificados, na mesma maneira em que eles são formados em polipeptídeos que ocorrem naturalmente. Contudo, os aminoácidos codificados não naturalmente têm grupos de cadeia lateral que se distinguem dos mesmos a partir dos aminoácidos naturais. Por exemplo, R opcionalmente compreende um grupo alquila, arila, acila,

ceto, azido, hidroxila, hidrazina, ciano, halo, hidrazida, alquenila, alquinila, éter, tiol, seleno, sulfonila, borato, boronato, fosfo, fosfono, fosfina, heterocíclico, enona, imina, aldeído, éster, tioácido, hidroxilamina, amino, ou similares, ou qualquer combinação destes. Outros aminoácidos que ocorrem não naturalmente de interesse que podem ser adequados para uso na presente invenção incluem, mas não são limitados a, aminoácidos compreendendo um reticulador fotoativável, aminoácidos etiquetados por centrifugação, aminoácidos fluorescentes, aminoácidos de ligação de metal, aminoácidos contendo metal, aminoácidos radioativos, aminoácidos com novos grupos funcionais, aminoácidos que interagem covalentemente ou não covalentemente com outras moléculas, aminoácidos fotoengaiolados e/ou foto isomerizáveis, aminoácidos compreendendo biotina ou um análogo de biotina, aminoácidos glicosilados, tais como serina substituída com açúcar, outros aminoácidos modificados com hidrato de carbono, aminoácidos contendo ceto, aminoácidos compreendendo polietileno glicol ou poliéter, aminoácidos substituídos com átomo pesado, aminoácidos quimicamente cliváveis e/ou fotocliváveis, aminoácidos com cadeias laterais alongadas conforme comparados a aminoácidos naturais, incluindo, mas não limitados a, poliéteres ou hidrocarbonetos de cadeia longa, incluindo, mas não limitados a, maiores do que cerca de 5 ou maiores do que cerca de 10 carbonos, aminoácidos contendo açúcar ligados a carbono, aminoácidos redox-ativos, aminoácidos contendo amino tioácido, e aminoácidos compreendendo uma ou mais fração tóxica.

[0070] Os aminoácidos codificados não naturalmente exemplares que podem ser adequados para uso na presente invenção, e que são úteis para reações com polímeros solúveis em água, incluem, mas não são limitados a, aqueles com grupos carbonila, amino-óxi, hidrazina, hidrazida, semicarbazida, azida e grupos reativos de alquino. Em algumas concretizações, aminoácidos codificados não naturalmente

compreendem uma fração de sacarídeo. Exemplos de tais aminoácidos incluem N-acetil-L-glucosaminil-L-serina, N-acetil-L-galactosaminil-L-serina, N-acetil-L-glucosaminil-L-treonina, N-acetil-L-glucosaminil-L-asparagina e O-manosaminil-L-serina. Exemplos de tais aminoácidos também incluem exemplos onde a ligação-O ou -N que ocorre naturalmente entre o aminoácido e o sacarídeo é substituída por uma ligação covalente não comumente encontrada na natureza, incluindo, mas não limitada a, um alqueno, uma oxima, um tioéter, uma amida e similares. Exemplos de tais aminoácidos também incluem sacarídeos que não são comumente encontrados em proteínas que ocorrem naturalmente, tais como 2-deóxi-glicose, 2-deoxigalactose, e similares.

[0071] Outro tipo de modificação que pode opcionalmente ser introduzido nas proteínas de ANGPTL3 da invenção (por exemplo, dentro da cadeia de polipeptídeo, ou em ou N- ou C-terminal), por exemplo, para prolongar meia-vida *in vivo*, é PEGilação ou incorporação de polímeros de polietileno glicol de cadeia longa (PEG). A introdução de PEG ou polímeros de cadeia longa de PEG aumenta o peso molecular efetivo dos presentes polipeptídeos, por exemplo, para impedir rápida filtração na urina. Em algumas concretizações, um resíduo de Lisina na sequência de ANGPTL3 é conjugado em PEG diretamente, ou através de um ligador. Tal ligador pode ser, por exemplo, um resíduo Glu, ou um resíduo acila contendo um grupo funcional tiol para ligação à cadeia de PEG apropriadamente modificada. Um método alternativa para introdução de uma cadeia de PEG é primeiro introduzir um resíduo de Cys no C-terminal ou em resíduos expostos a solvente, tais como substituições para resíduos de Arg ou Lys. Este resíduo de Cys é, em seguida, fixado especificamente por local a uma cadeia de PEG contendo, por exemplo, uma função de maleimida. Métodos para incorporação de PEG ou de polímeros de cadeia longa de PEG são bem conhecidos na técnica (descritos, por exemplo, em Veronese, F. M., et

al., *Drug Disc. Today* 10: 1451-8 (2005); Greenwald, R. B., et al., *Adv. Drug Deliv. Rev.* 55: 217-50 (2003); Roberts, M. J., et al., *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 54: 459-76 (2002)), os conteúdos dos quais são incorporados aqui por referência. Outros métodos de conjugações de polímero conhecidos na técnica podem também serem usados na presente invenção. Em algumas concretizações, poli(2-metacrilóiloxietil fosforilcolina) (PMPC) é introduzida como um conjugado de polímero com as proteínas de ANGPTL3 da invenção (ver, por exemplo, WO2008/098930; Lewis, et al., *Bioconjug Chem.*, 19: 2144-55 (2008)). Em algumas concretizações, um conjugado de polímero contendo fosforilcolina com as proteínas de ANGPTL3 pode ser usado na presente invenção. Um técnico no assunto reconhecerá prontamente que outros conjugados de polímero biocompatíveis podem ser utilizados.

[0072] Uma abordagem alternativa mais recentemente reportada para incorporação de PEG, ou de polímeros de PEG, através da incorporação de aminoácidos não naturais (conforme descrito acima), pode ser realizada com o presente polipeptídeos. Esta abordagem utiliza um par de tRNA/tRNA sintetase desenvolvido, e é codificado no plasmídeo de expressão pelo códon de supressor âmbar (Deiters, A, et al. (2004). *Bio-org. Med. Chem. Lett.* 14, 5743-5). Por exemplo, p-azidofenilalanina pode ser incorporada nos presentes polipeptídeos e, em seguida, reagida com um polímero de PEG tendo uma fração de acetileno na presença de um agente de redução e íons de cobre para facilitar uma reação orgânica conhecida como "Huisgen [3+2]cicloadição".

[0073] Em certas concretizações, a presente invenção também contempla mutações específicas das proteínas de ANGPTL3, de modo a alterar a glicosilação do polipeptídeo. Tais mutações podem ser selecionadas de modo a introduzir ou eliminar um ou mais locais de glicosilação, incluindo, mas não limitados a, locais de ligação O-ligados ou N-ligados. Em certas concretizações, as proteínas de ANGPTL3 da

presente invenção têm locais de glicosilação e padrões inalterados relativos às proteínas de ANGPTL3 que ocorrem naturalmente. Em certas concretizações, uma variante de proteínas de ANGPTL3 inclui uma variante de glicosilação no qual o número e/ou tipo de locais de glicosilação foram alterados relativos às proteínas de ANGPTL3 que ocorrem naturalmente. Em certas concretizações, uma variante de um polipeptídeo compreende um maior ou um menor número de locais de glicosilação N-ligados relativos a um polipeptídeo nativo. Um local de glicosilação N-ligado é caracterizado pela sequência: Asn-X-Ser ou Asn-X-Thr, no qual o resíduo de aminoácido designado como X pode ser qualquer resíduo aminoácido, exceto prolina. A substituição de resíduos de aminoácido para criar esta sequência proporciona um potencial novo local para a adição de uma cadeia de hidrato de carbono N-ligada. Alternativamente, as substituições que eliminam esta sequência removerão uma cadeia de hidrato de carbono N-ligada existente. Em certas concretizações, um rearranjo de cadeias de hidrato de carbono N-ligadas é proporcionado, no qual um ou mais locais de glicosilação N-ligados (tipicamente aqueles que estão ocorrendo naturalmente) são eliminados e um ou mais novos locais N-ligados são criados.

[0074] Variantes de proteínas de ANGPTL3 exemplares incluem variantes de cisteína no qual um ou mais resíduos de cisteína são anulados de ou substituídos por outro aminoácido (por exemplo, serina) relativos à sequência de aminoácido das proteínas de ANGPTL3 que ocorrem naturalmente. Em certas concretizações, variantes de cisteína podem ser úteis quando as proteínas de ANGPTL3 devem ser redobradas em uma conformação biologicamente ativa, tal como após o isolamento de corpos de inclusão insolúveis. Em certas concretizações, as variantes de cisteína têm menos resíduos de cisteína do que o polipeptídeo nativo. Em certas concretizações, as variantes de cisteína têm um ainda número de resíduos de cisteína para minimizar inte-

rações resultantes de cisteínas não emparelhadas.

[0075] Em algumas concretizações, variantes funcionais ou formas modificadas das proteínas de ANGPTL3 incluem proteínas de fusão de uma proteína de ANGPTL3 da invenção e um ou mais domínios de fusão. Exemplos bem conhecidos de domínios de fusão incluem, mas não são limitados a, poli-histidina, Glu-Glu, glutathione S transferase (GST), tioredoxina, proteína A, proteína G, uma região constante de cadeia pesada de imunoglobulina (Fc), proteína de ligação de maltose (MBP), e/ou albumina do soro humano (HSA). Um domínio de fusão, ou um fragmento deste, pode ser selecionado de modo a conferir uma propriedade desejada. Por exemplo, alguns domínios de fusão são particularmente úteis para o isolamento das proteínas de fusão por cromatografia de afinidade. Para a proposta de purificação de afinidade, matrizes relevantes para cromatografia de afinidade, tais como resinas conjugadas a glutathione, amilase, e níquel ou cobalto, são usadas. Muitas de tais matrizes são disponíveis em forma de "kit", tal como o sistema de purificação Pharmacia GST e o sistema QLAexpressTM (Qiagen) úteis com padrões de fusão (HIS₆). Como outro exemplo, um domínio de fusão pode ser selecionado de modo a facilitar a detecção das proteínas de ANGPTL3. Exemplos de tais domínios de detecção incluem as várias proteínas fluorescentes (por exemplo, GFP) bem como "etiquetas de epítipo", que são usualmente sequências de peptídeo curtas para qual um anticorpo específico é disponível. Etiquetas de epítipo bem conhecidas para qual anticorpos monoclonais específicos são principalmente disponíveis incluem FLAG, hemaglutinina do vírus da gripe (HA), e etiquetas c-myc. Em alguns casos, os domínios de fusão têm um local de clivagem de protease, tais como para Fator Xa ou Trombina, que permitem que a protease relevante digira parcialmente as proteínas de fusão e, desse modo, liberem as proteínas recombinantes destas. As proteínas liberadas podem, em seguida, se-

rem isoladas a partir do domínio de fusão por separação cromatográfica subsequente. Em certas concretizações, uma proteína de ANG-PTL3 é fundida com um domínio que estabiliza a proteína de ANG-PTL3 *in vivo* (um domínio "estabilizador"). Por "estabilização" é significativo que o aumento da meia-vida do soro, indiferente de se este é devido a destruição diminuída, diminui a liberação pelo rim, ou outro efeito farmacocinético. Fusões com a porção Fc de uma imunoglobulina são conhecidas por conferir propriedades farmacocinéticas desejáveis em uma ampla faixa de proteínas. Do mesmo modo, fusões em albumina do soro humano podem conferir propriedades desejáveis. Outros tipos de domínios de fusão que podem ser selecionados incluem domínios de multimerização (por exemplo, dimerização, tetramerização) e domínios funcionais (que conferem uma função biológica adicional, conforme desejado). Fusões podem ser construídos tal que o peptídeo heterólogo é fundido no amino terminal de um polipeptídeo da invenção e/ou no carbóxi terminal de um polipeptídeo da invenção.

[0076] Ácidos nucleicos que codificam polipeptídeos resistentes à protease similares à angiopoietina-3

[0077] A invenção também proporciona ácidos nucleicos que codificam polipeptídeos resistentes à protease da invenção e vetores de expressão e células hospedeiras para expressão de um polipeptídeo resistente à protease. Em outros aspectos, a invenção proporciona um polinucleotídeo que codifica um polipeptídeo da invenção e vetores de expressão e células hospedeiras compreendendo tal polinucleotídeo. Em algumas concretizações, o polinucleotídeo é otimizado para expressão nas células hospedeiras. Em algumas concretizações, a invenção proporciona um método de melhora ou prevenção de artrite ou dano da articulação em um paciente humano, o método compreendendo: administrar a uma articulação do paciente um vetor de expressão que codifica um polipeptídeo da invenção, pelo que a expressão

do polipeptídeo melhora ou impede artrite ou dano da articulação no paciente. Em algumas concretizações, o paciente tem artrite ou dano da articulação. Em algumas concretizações, o indivíduo não tem, mas está em risco de artrite ou dano da articulação. Em algumas concretizações, a artrite é osteoartrite, artrite por trauma, ou artrite autoimune.

[0078] A expressão de polipeptídeos da invenção emprega técnicas de rotina no campo de genéticos recombinantes. Textos básicos revelando os métodos gerais nesta invenção incluem Sambrook and Russell eds. (2001) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 3rd edition; as séries Ausubel et al. eds. (2007 com atualização a 2010) *Current Protocols in Molecular Biology*, entre outros conhecidos na técnica.

[0079] A expressão pode empregar quaisquer células hospedeiras apropriadas conhecidas na técnica, por exemplo, células hospedeiras de mamífero, células hospedeiras bacteriais, células hospedeiras de levedura, células hospedeiras de inseto, etc. Ambos sistemas de expressão procarióticos e eucarióticos são amplamente disponíveis. Em algumas concretizações, o sistema de expressão é uma expressão de célula de mamífero, tal como um sistema de expressão de célula CHO. Em algumas concretizações, um ácido nucleico pode ser otimizado por códon para facilitar expressão em uma célula hospedeira desejada.

[0080] Vetores e sistemas não virais incluem vetores de plasmídeo e episomal, tipicamente compreendendo um cassete de expressão para expressão de uma proteína ou RNA, e cromossomos artificiais humanos (ver, por exemplo, Harrington et al., *Nat Genet* 15:345, 1997). Por exemplo, vetores não virais úteis para expressão do polipeptídeos da invenção em células de mamífero (por exemplo, humani) incluem pThioHis A, B & C, pcDNA3. I/His, pEBVHis A, B & C (Invitrogen, San Diego, CA), vetores de MPSV, e numerosos outros vetores conhecidos na técnica para expressão de outras proteínas. Vetores

virais úteis incluem, mas não são limitados a, vetores baseados no adenovírus, vírus adenoassociados, vírus da herpes, vetores baseados no SV40, vírus papiloma, vírus HBP Epstein Barr, vetores de fowpox, vetores de vírus de vaccinia e vírus Semliki Forest (SFV).

[0081] A escolha de vetor de expressão depende das células hospedeiras pretendidas em que o vetor é para ser expresso. Tipicamente, os vetores de expressão contêm um promotor e outras sequências regulatórias (por exemplo, intensificadores) que são operavelmente ligadas aos polinucleotídeos que codificam um polipeptídeo da invenção. Em algumas concretizações, um promotor induzível é empregado para impedir expressão das sequências inseridas, exceto sob condições de indução. Os promotores indizíveis incluem, por exemplo, arabinose, lacZ, um promotor de metalotioneína, promotores de glucocorticoide, ou um promotor de choque de calor. Em adição, outros elementos regulatórios podem também serem incorporados para aperfeiçoar expressão de um ácido nucleico que codifica um polipeptídeo da invenção, por exemplo, intensificadores, local de ligação ribossomal, sequências de terminação de transcrição, e similares.

[0082] Em algumas concretizações, um ácido nucleico que codifica um polipeptídeo da invenção pode também incluir uma sequência que codifica uma sequência de sinal de secreção de modo que o polipeptídeo é secretado a partir da célula hospedeira. Tal sequência pode ser proporcionada pelo vetor, ou como parte do ácido nucleico de ANG-PTL3 que está presente no vetor.

[0083] Métodos para introdução de vetores de expressão contendo a sequência de polinucleotídeos de interesse variam dependendo do tipo de hospedeiro celular. Por exemplo, transfecção de cloreto de cálcio é comumente utilizada para células procarióticas, onde tratamento com fosfato de cálcio, ou eletroporação, pode ser usado para outros hospedeiros celulares (ver geralmente *Sambrook et al., supra*). Outros

métodos incluem, por exemplo, eletroporação, tratamento com fosfato de cálcio, transformação mediada por lipossoma, injeção e microinjeção, métodos balísticos, virossomos, imunolipossomos, polication: conjugados de ácido nucleico, DNA nu, virions artificiais, fusão à proteína estrutural do vírus da herpes VP22, entrada intensificada de agente de DNA, e transição *ex vivo*. Para longo prazo, a produção de alto rendimento de proteínas recombinantes, expressão estável será frequentemente desejada. Por exemplo, linhas de célula que expressam estávelmente os polipeptídeos da invenção podem ser preparadas usando vetores de expressão da invenção que contêm origens virais de replicação ou elementos de expressão endógenos e um gene de marcador selecionável.

[0084] Em algumas concretizações, os ácidos nucleicos que codificam polipeptídeos resistentes à protease de ANGPTL3 da invenção podem ser distribuídos a um paciente para tratamento de um dano ou doença relacionada à articulação. A distribuição de tais ácidos nucleicos pode ser alcançada usando qualquer meio conhecido na técnica, mas é tipicamente realizada usando injeção direta na articulação afetada. Em algumas concretizações, um DNA é distribuído como DNA nu usando injeção direta na articulação. Em algumas concretizações, um vetor viral é empregado, incluindo, mas não limitado a, um adenovírus ou vetor associado a adenovírus, um vetor do vírus da herpes, um vírus de fowlpox, ou um vetor de vírus de vaccinia.

Métodos de uso terapêutico de polipeptídeos, e indicações

[0085] Os métodos proporcionados da invenção incluem um método de tratamento de um indivíduo compreendendo administrar ao indivíduo uma quantidade terapêuticamente efetiva de um polipeptídeo da invenção, no qual o indivíduo tem ou está em risco de dano articular ou artrite. A invenção também proporciona um método de melhora ou prevenção de artrite ou dano da articulação em um paciente humano,

o método compreendendo: administrar a uma articulação do paciente uma composição compreendendo uma quantidade efetiva de um polipeptídeo da invenção, melhorando ou impedindo, desse modo, artrite ou dano da articulação no paciente. Em algumas concretizações, o paciente tem artrite ou dano da articulação. Em algumas concretizações, o indivíduo não tem, mas está em risco de, artrite ou dano da articulação. Em algumas concretizações, a artrite é osteoartrite, artrite por trauma, ou artrite autoimune. Em algumas concretizações, a composição administrada compreende adicionalmente ácido hialurônico.

[0086] Em outro aspecto, a invenção proporciona um método de indução de diferenciação de células tronco mesenquimais em condrócitos, o método compreendendo contatar células tronco mesenquimais com uma quantidade suficiente de um polipeptídeo da invenção para induzir diferenciação das células troncos em condrócitos. Em algumas concretizações, o método é realizado *in vivo*, e as células troncos estão presentes em um paciente humano.

[0087] É contemplado que polipeptídeos, composições, e métodos da presente invenção podem ser usados para tratar, melhorar ou prevenir qualquer tipo de dano de cartilagem articular (por exemplo, dano articular ou injúria) incluindo, por exemplo, dano que ocorre de um evento traumático ou desgaste de tendão ou de ligamento. Em algumas concretizações, as proteínas da invenção são administradas para prevenir ou melhorar artrite ou dano articular, por exemplo, onde existe uma história genética ou de família de artrite ou dano articular, ou dano da articulação, ou antes ou durante cirurgia de articulação. Em algumas concretizações, polipeptídeos, composições e métodos são usados para tratar dano articular. Em concretizações particulares, dano articular é dano da articulação traumático. Em outras concretizações, dano articular é dano que ocorre da idade ou inatividade. Em ainda outras concretizações, dano articular é dano que ocorre de um distúr-

bio autoimune. Em algumas concretizações da invenção, polipeptídeos, composições, e métodos da presente invenção podem ser usados para tratar, melhorar ou prevenir osteoartrite. Em algumas concretizações, os polipeptídeos, composições e métodos são usados para melhorar ou prevenir artrite em um indivíduo em risco de ter ou adquirir artrite. Em algumas concretizações, os polipeptídeos, composições e métodos são usados para melhorar ou prevenir dano articular em um indivíduo em risco de ter ou adquirir dano articular.

[0088] Em algumas concretizações, polipeptídeos, composições, e métodos da presente invenção proporcionam um método para estimulação de proliferação de condrócito e produção de cartilagem em tecidos cartilagenosos que foram danificados, por exemplo, devido a dano traumático ou condropatia. Em concretizações particulares, polipeptídeos, composições, e métodos da presente invenção são úteis para tratamento de dano de cartilagem em articulações, por exemplo, em superfícies articuladas, por exemplo, coluna, ombro, cotovelo, pulso, articulações dos dedos, quadril, joelho, tornozelo, e articulações dos pés. Exemplos de doenças ou distúrbios que podem se beneficiar de tratamento incluem osteoartrite, artrite reumatoide, outras doenças autoimunes, ou osteocondrite. Em adição, dano ou rompimento da cartilagem ocorre como um resultado de certos distúrbios genéticos ou metabólicos, malformação da cartilagem é frequentemente vista em formas de nanismo em humanos, e/ou dano ou rompimento de cartilagem é frequentemente um resultado de cirurgia reconstrutiva; desse modo, polipeptídeos, composições, e métodos seriam terapia útil nestes pacientes, se sozinha ou em conjunto com outras abordagens.

[0089] É adicionalmente contemplado que polipeptídeos, composições, e métodos da presente invenção podem ser usados para tratar, melhorar ou prevenir vários distúrbios cartilagenosos e/ou sintomas associados, ou efeitos de tais condições. Condições ou distúrbios

exemplares para tratamento, melhora e/ou prevenção com polipeptídeos, composições, e métodos da invenção, incluem, mas não são limitados a, lúpus sistêmico eritematoso, artrite reumatoide, artrite crônica juvenil, osteoartrite, doença de disco degenerativa, espondiloartropatias, síndrome de Ehlers Danlos, esclerose sistêmica (escleroderma), ou doença de tendão. Outras condições ou distúrbios que podem se beneficiar de tratamento com polipeptídeos para melhora de efeitos associados incluem miopatias inflamatórias idiopáticas (dermatomiosite, polimiosite), síndrome de Sjogren, vasculite sistêmica, sarcoidose, anemia hemolítica autoimune (pancitopenia imune, hemoglobinúria noturna paroxismal), trombocitopenia imune (púrpura trombocitopênica idiopática, trombocitopenia imune-mediada), tireoidite (doença Grave, tireoidite de Hashimoto, tireoidite linfocítica juvenil, tireoidite atrofica), diabetes mellitus, doença renal imune-mediada (glomerulonefrite, nefrite tubulointersticial), doenças de demielinação dos sistemas nervosos central e periférico, tais como esclerose múltipla, polineuropatia de demielinação idiopática ou síndrome de Guillain-Barré, e polineuropatia de demielinação inflamatória crônica, doenças hepatobiliares, tais como hepatites infecciosas (hepatite A, B, C, D, E e outros vírus não hepatotrópicos), hepatite ativa crônica autoimune, cirrose biliar primária, hepatite granulomatosa, e colangite esclerosante, doença inflamatória do intestino (colite ulcerativa: doença de Crohn), enteropatia sensível à glúten, e doença de Whipple, doenças da pele autoimune ou imune-mediada, incluindo doenças da pele bolhosa, eritema multiforme e dermatite de contato, psoríase, doenças alérgicas, tais como asma, rinite alérgica, dermatite atópica, hipersensibilidade a alimento, e urticária, doenças imunológicas do pulmão, tais como pneumonias eosinofílicas, fibrose pulmonar idiopática e pneumonite de hipersensibilidade, doenças associadas a transplante, incluindo rejeição de enxerto, e doença de enxerto-versus-hospedeiro.

[0090] Um "paciente", conforme aqui usado, se refere a qualquer indivíduo que é administrado um polipeptídeo terapêutico da invenção. É contemplado que polipeptídeos, composições, e métodos da presente invenção podem ser usados para tratar um mamífero. Conforme aqui usado, um "indivíduo" se refere a qualquer mamífero, incluindo humanos, animais domésticos e de fazenda, e zoo, esportes ou animais de estimação, tal como gado (por exemplo, vacas), cavalos, cães, ovelha, porcos, coelhos, cabras, gatos, etc. Em algumas concretizações da invenção, o indivíduo é um humano. Em certas concretizações, o indivíduo é um cavalo. Em outras concretizações, o indivíduo é um cão.

[0091] Em algumas concretizações, os polipeptídeos da invenção podem ser heterólogos ao mamífero a ser tratado. Por exemplo, uma proteína de ANGPTL3 humana ou fragmentos desta, uma proteína ou peptídeo derivado de uma proteína de ANGPTL3 humana (por exemplo, uma proteína de ANGPTL3 humana modificada, uma variante conservativa de proteína de ANGPTL3 humana, um peptidomimético derivado de uma proteína de ANGPTL3 humana) são usados no tratamento de um animal, tal como um equino, bovino ou canino. Em algumas concretizações, uma proteína de ANGPTL3 heteróloga pode ser usada para expandir populações de condrócito em cultura para transplante. Em algumas concretizações, as culturas expandidas, em seguida, serão opcionalmente misturadas com polipeptídeos e composições homólogos ao mamífero a ser tratado, e colocados no espaço da articulação, ou diretamente no defeito da cartilagem. Alternativamente, os polipeptídeos da invenção são derivados a partir da mesma espécie, isto é, uma proteína de ANGPTL3 humana, ou fragmentos desta, uma proteína ou peptídeo derivado de uma proteína de ANGPTL3 humana (por exemplo, uma proteína de ANGPTL3 humana modificada, uma variante conservativa de proteína de ANGPTL3 humana,

um peptidomimético derivado de uma proteína de ANGPTL3 humana), é usado no tratamento de um paciente humano. Pelo uso de uma proteína derivada a partir da mesma espécie de mamífero conforme está sendo tratada, respostas imunes inadvertentes podem ser evitadas.

[0092] Em algumas concretizações, polipeptídeos e composições da presente invenção são aplicados por injeção direta no fluido sinovial de uma articulação, administração sistêmica (oral ou intravenosamente), ou diretamente em um defeito de cartilagem, ou sozinhos ou complexados com um transportador adequado para liberação prolongada de proteína. Em algumas concretizações, os polipeptídeos ou composições são administrados em uma matriz biocompatível ou suporte. Os polipeptídeos, composições, e métodos da presente invenção podem também serem usados em conjunto com um procedimento cirúrgico a uma articulação afetada. A administração de um polipeptídeo da invenção pode ocorrer antes de, durante, ou em conjunto com, e/ou após um procedimento cirúrgico. Por exemplo, polipeptídeos, composições e métodos da invenção podem ser usados para expandir populações de condrócito em cultura para implante de condrócito autólogo ou alogênico (ACI). Os condrócitos podem ser opcionalmente implantados com tratamento concorrente consistindo em administração de polipeptídeos e composições da presente invenção. Nestes procedimentos, por exemplo, os condrócitos podem ser coletados artroscopicamente de uma área de suporte de carga menor que não sofreu dano de uma articulação danificada, e podem ser cultivados *in vitro*, opcionalmente na presença de polipeptídeos e composições da presente invenção, e/ou outros fatores de crescimento para aumentar o número de células antes do transplante. As culturas expandidas são, em seguida, opcionalmente misturadas com polipeptídeos e composições da presente invenção, e/ou colocadas no espaço da articulação, ou diretamente no defeito. Em certas concretizações, as culturas expandidas (opcional-

mente com polipeptídeos da presente invenção), são colocadas no espaço da articulação suspensa em uma matriz ou membrana. Em outras concretizações, os polipeptídeos e composições da presente invenção podem ser usadas em combinação com um ou mais enxertos periosteal ou pericondrial que contêm células de formação de cartilagem, e/ou ajudam manter os condrócitos transplantados ou células precursoras de condrócito no lugar. Em algumas concretizações, os polipeptídeos e composições da presente invenção são usados para reparar dano da cartilagem em conjunto com outros procedimentos, incluindo, mas não limitados a, lavagem de uma articulação, estimulação da medula óssea, artroplastia de abrasão, perfuração subcondral, ou microfratura de osso subcondral proximal. Opcionalmente, seguindo administração de polipeptídeos e composições da presente invenção e crescimento de cartilagem, tratamento cirúrgico adicional pode ser benéfico para contornar adequadamente superfície(s) de cartilagem recentemente formada(s).

Composições farmacêuticas

[0093] Composições terapêuticas compreendendo os polipeptídeos proporcionados estão dentro do escopo da presente invenção, e são especificamente contemplados à luz da identificação de várias sequências de polipeptídeo que exibem estabilidade intensificada e resistência á protease. Desse modo, em um aspecto adicional, a invenção proporciona uma composição farmacêutica compreendendo uma quantidade terapeuticamente efetiva de um polipeptídeo da invenção. Em certas concretizações, composições farmacêuticas compreendem adicionalmente um transportador farmacêuticamente ou fisiologicamente aceitável. Em algumas concretizações, uma composição farmacêutica compreende adicionalmente um ácido hialurônico ou um derivado deste.

[0094] Em adição, a invenção proporciona um método de melhora

ou prevenção de artrite ou dano da articulação em um paciente humano, o método compreendendo: administrar a uma articulação do paciente uma composição compreendendo uma quantidade efetiva de um polipeptídeo da invenção, desse modo, melhorando ou prevenindo artrite ou dano da articulação no paciente. Em algumas concretizações, o paciente tem artrite ou dano da articulação. Em algumas concretizações, o indivíduo não tem, mas está em risco de, artrite ou dano da articulação. Em algumas concretizações, a artrite é osteoartrite, artrite por trauma, ou artrite autoimune. Em algumas concretizações, a composição administrada compreende adicionalmente ácido hialurônico.

[0095] Em outro aspecto, a invenção proporciona um método de indução de diferenciação de células troncos mesenquimais em condrócitos, o método compreendendo, contatar células troncos mesenquimais com uma quantidade suficiente de um polipeptídeo da invenção, para induzir diferenciação das células troncos em condrócitos. Em algumas concretizações, o método é realizado *in vivo*, as células troncos estão presentes em um paciente humano, e o contato compreende administrar a uma articulação do paciente uma composição compreendendo uma quantidade efetiva de um polipeptídeo da invenção, induzindo, desse modo, diferenciação de células troncos em condrócitos, e geração de cartilagem.

[0096] As composições terapêuticas compreendendo ácidos nucleicos que codificam polipeptídeos da invenção podem ser distribuídas a um paciente para tratamento de um dano ou doença relacionada à articulação, e estão também dentro do escopo da presente invenção. Em algumas concretizações, as composições farmacêuticas compreendem um DNA nu que codifica um polipeptídeo da invenção. Em algumas concretizações, um vetor viral é empregado para efetuar distribuição, e uma composição farmacêutica compreende um vetor que codifica um polipeptídeo da invenção, incluindo, mas não limitados a,

um adenovírus ou vetor associado a adenovírus, um vetor do vírus da herpes, vírus de fowlpox, ou um vetor de vírus da vaccinia. As composições farmacêuticas compreendem uma quantidade terapeuticamente efetiva de um ácido nucleico que codifica um polipeptídeo da invenção com um transportador farmacêuticamente ou fisiologicamente aceitável.

[0097] Em outro aspecto da presente invenção, polipeptídeos proporcionados para uso como um medicamento para tratamento de dano articular, são contemplados. Em certas concretizações, polipeptídeos da invenção para uso como um medicamento para melhora de artrite ou dano articular, são proporcionados. Em algumas concretizações, a artrite é osteoartrite, artrite por trauma, ou artrite autoimune. Em algumas concretizações, o dano articular é dano da articulação traumático, dano autoimune, dano relacionado a idade, ou dano relacionado a inatividade. Em outras concretizações, o ácido nucleico que codifica um polipeptídeo da invenção para uso em um medicamento, é proporcionado.

[0098] Formulações adequadas para administração incluem excipientes, incluindo, mas não limitados a, soluções aquosas e não aquosas, soluções estéreis isotônicas, que podem conter antioxidantes, tampões, bacteriostatos, e solutos que tornam a formulação isotônica, e suspensões estéreis aquosas e não aquosas que podem incluir agentes de suspensão, solubilizadores, agentes de espessamento, estabilizadores, e conservantes. Em certas concretizações, as composições farmacêuticas compreendem uma quantidade terapeuticamente efetiva de um peptídeo em mistura com um agente de formulação farmacêuticamente aceitável selecionado para adequabilidade com o modo de administração, formato de distribuição, e dosagem desejada. Ver, por exemplo, Remington's Pharmaceutical Sciences (18th Ed., A.R. Gennaro, ed., Mack Publishing Company 1990), e edições subsequen-

tes do mesmo. O veículo primário ou transportador em uma composição farmacêutica pode ser aquoso ou não aquoso na natureza. Por exemplo, um veículo ou transportador adequado para injeção pode ser água, solução de salina fisiológica, ou fluido artificial cérebro-espinhal, opcionalmente suplementado com outros materiais comuns em composições para administração parenteral. Por exemplo, tampões podem ser usados, por exemplo, para manter a composição a pH fisiológico, ou a um pH levemente mais baixo, tipicamente dentro de uma faixa de cerca de pH 5 a cerca de pH 8, e pode, opcionalmente, incluir sorbitol, albumina de soro, detergente, ou outro componente adicional. Em certas concretizações, as composições farmacêuticas compreendendo polipeptídeos, ou um ácido nucleico que codifica um polipeptídeo da invenção, podem ser preparadas para armazenagem em uma forma liofilizada usando excipientes apropriados (por exemplo, sacarose).

[0099] Em ainda outras concretizações, a formulação com um agente, tais como microesferas injetáveis, partículas bioerodíveis, compostos poliméricos, contas, ou lipossomos, ou outra matriz biocompatível que proporcionam liberação controlada ou sustentada do polipeptídeo ou um ácido nucleico que codifica um polipeptídeo da invenção, pode, em seguida, ser distribuída, via uma injeção de depósito. Por exemplo, os polipeptídeos ou ácido nucleico que codifica um polipeptídeo da invenção, podem ser encapsulados em lipossomos, ou formulados como micropartículas ou microcápsulas, ou podem ser incorporados em outros veículos, tais como polímeros biodegradáveis, hidrogéis, ciclodextrinas (ver, por exemplo, Gonzalez et al., 1999, *Bioconjugate Chem.*, 10, 1068-1074; Wang et al., *Publicações Internacionais PCT Nos. WO 03/47518 e WO 03/46185*), ácido poli(láctico-co-glicólico) (PLGA), e microesferas de PLGA (ver, por exemplo, *Patente dos Estados Unidos No. 6.447.796 e Publicação de Pedido de Patente dos Estados Unidos No. US 2002130430*), nanocápsulas biodegradá-

veis, e microesferas bioadesivas, ou por vetores proteínáceos (O'Hare and Normand, Publicação Internacional PCT No. WO 00/53722), ou pelo uso de conjugados. Ainda outros mecanismos de distribuição adequados incluem dispositivos de distribuição implantáveis.

[00100] A dose de um composto da presente invenção para tratamento das doenças ou distúrbios acima mencionados varia, dependendo da maneira de administração, a idade e/ou o peso corpóreo do indivíduo, e a condição do indivíduo a ser tratada, e finalmente será decidida pelo médico ou veterinário. A dose administrada a um indivíduo, no contexto da presente invenção, deve ser suficiente para afetar uma resposta benéfica no indivíduo com o tempo. Tal dose é uma "quantidade terapêuticamente efetiva". Consequentemente, uma dose apropriada pode ser determinada pela eficiência da proteína particular ou um ácido nucleico que codifica um polipeptídeo da invenção empregado, e a condição do indivíduo, bem como o peso corpóreo ou área superficial da área a ser tratada. O tamanho da dose também será determinado pela existência, natureza, e extensão de qualquer efeito colateral adverso que acompanha a administração da proteína particular ou vetor em um indivíduo particular. A administração pode ser acompanhada, via doses únicas ou divididas, ou como uma infusão contínua, via um dispositivo de implantação ou cateter. A frequência de dosagem depende dos parâmetros farmacocinéticos do polipeptídeo ou um ácido nucleico que codifica um polipeptídeo da invenção na formulação usada. Um clínico pode titular a dosagem e/ou modificar a administração, para alcançar os efeitos terapêuticos desejados. Uma dosagem típica varia de cerca de 0,01 µg/kg a cerca de 100 mg/kg, dependendo dos fatores. Em certas concretizações, uma dosagem varia de cerca de 0,1 µg/kg até cerca de 10 mg/kg; ou cerca de 0,1 µg/kg; cerca de 0,5 µg/kg; cerca de 1 µg/kg; cerca de 2 µg/kg; cerca de 5 µg/kg; cerca de 10 µg/kg; cerca de 15 µg/kg; cerca de 20 µg/kg; cer-

ca de 25 µg/kg; cerca de 30 µg/kg; cerca de 35 µg/kg; cerca de 40 µg/kg; cerca de 45 µg/kg; cerca de 50 µg/kg; cerca de 55 µg/kg; cerca de 60 µg/kg; cerca de 65 µg/kg; cerca de 75 µg/kg; cerca de 85 µg/kg; cerca de 100 µg/kg. Em certas concretizações, uma dosagem é cerca de 50 µg/kg; cerca de 100 µg/kg; cerca de 150 µg/kg; cerca de 200 µg/kg; cerca de 250 µg/kg; cerca de 300 µg/kg; cerca de 350 µg/kg; cerca de 400 µg/kg; cerca de 450 µg/kg; cerca de 500 µg/kg; cerca de 550 µg/kg; cerca de 600 µg/kg; cerca de 650 µg/kg; cerca de 700 µg/kg; cerca de 750 µg/kg; cerca de 800 µg/kg; cerca de 850 µg/kg; cerca de 900 µg/kg; cerca de 950 µg/kg; cerca de 1 mg/kg; cerca de 2 mg/kg; cerca de 3 mg/kg; cerca de 4 mg/kg; cerca de 5 mg/kg; cerca de 6 mg/kg; cerca de 7 mg/kg; cerca de 8 mg/kg; cerca de 9 mg/kg; cerca de 10 mg/kg.

Métodos de Administração

[00101] Qualquer método para distribuição das proteínas ou um ácido nucleico que codifica um polipeptídeo da invenção a uma articulação afetada, pode ser usado. Na prática desta invenção, as composições podem ser parenteralmente administradas, por exemplo, injetadas, por exemplo, intra-articularmente (isto é, em uma articulação), intravenosamente, intramuscularmente, subcutaneamente; infundida, ou implantada, por exemplo, em uma membrana, matriz, dispositivo, etc. Quando injetada, infundida ou implantada, a distribuição pode ser direcionada no tecido adequado ou articulação, e distribuição pode ser distribuição de bolo direta ou distribuição contínua. Em algumas concretizações, a distribuição pode ser em um tecido adequado localizado em proximidade a uma articulação afetada. Em algumas concretizações, a distribuição pode ser, via difusão, ou via bolo de liberação regulada. Em algumas concretizações, um sistema de liberação controlada (por exemplo, uma bomba) pode ser colocado em proximidade do alvo terapêutico, por exemplo, a articulação a qual o polipeptídeo é

administrado. Em outras concretizações, as composições podem ser selecionadas para ingestão, por exemplo, inalação ou distribuição oral.

[00102] Os polipeptídeos terapêuticos, ou um ácido nucleico que codifica um polipeptídeo da invenção, podem também serem usados efetivamente em combinação com um ou mais agentes ativos adicionais (por exemplo, ácido hialurônico, ou um derivado ou sal deste, fator de crescimento (por exemplo, FGF18, BMP7), agente condrogênico (por exemplo, calcitonina de salmão oral, SD-6010 (inibidor de iNOS), vitamina D3 (coliecalciferol), hidrolisato de colágeno, rusalatide acetato, insaponificáveis de abacate-soja (ASU), um composto descrito em WO2012/129562, cartogenina), um esteroide, um agente anti-inflamatório não esteroide (NSAID), etc.), dependendo da terapia desejada, ou efeito para aperfeiçoar ou intensificar o efeito terapêutico destes. Este processo pode envolver administrar ambos agentes ao paciente ao mesmo tempo, ou como uma composição simples, ou formulação farmacológica que inclui ambos agentes, ou por administração de duas composições ou formulação distintas, no qual uma composição inclui um polipeptídeo ou um polinucleotídeo que codifica um polipeptídeo da invenção, e o outro inclui o(s) segundo(s) agente(s). A administração de uma composição terapêutica compreendendo um polipeptídeo ou um polinucleotídeo que codifica um polipeptídeo da invenção pode preceder, ou seguir administração do segundo agente por intervalos variando de minutos a semanas.

[00103] As formulações de compostos podem ser armazenadas em frascos estéreis como uma solução, suspensão, gel, emulsão, sólido, ou como um pó desidratado ou liofilizado. As formulações podem ser apresentadas em recipientes vedados de dose unitária ou de multidose, tais como ampolas e frascos. Em algumas concretizações, as formulações podem ser apresentadas em seringas simples ou de multicâmaras pré-enchidas (por exemplo, seringas de líquido, lisoseringas). So-

luções e suspensões podem ser preparadas de pós estéreis, grânulos, e comprimidos do tipo previamente descritos.

[00104] Também proporcionados são kits compreendendo os polipeptídeos, ou um ácido nucleico que codifica um polipeptídeo da presente invenção. Em uma concretização, são proporcionados kits para produção de uma unidade de administração de dose única. O kit compreende um primeiro recipiente compreendendo um polipeptídeo seco, ou um ácido nucleico que codifica um polipeptídeo da invenção, e um segundo recipiente tendo uma fórmula de reconstituição aquosa. Em certas concretizações, um recipiente compreende uma seringa pré-enchida de câmara única. Em outras concretizações, os recipientes são envolvidos como uma seringa pré-enchida de câmaras múltiplas.

Exemplificação

[00105] Os seguintes exemplos são oferecidos para ilustrar, mas não limitar a invenção reivindicada.

Exemplo 1: Construtos de peptídeo de ANGPTL3 resistente à protease

[00106] Vários mutantes de truncamento N-terminais foram construídos para remover glicosilações O-ligadas e facilitar a caracterização de proteína biofísica. Para identificar os peptídeos resistentes à protease, as substituições de aminoácido foram introduzidas em várias posições de fragmentos de peptídeo de Angptl3 humana correspondente a região C-terminal do peptídeo. A Figura 1 mostra posições de mutações na Angptl3 humana. Os construtos foram inicialmente preparados com etiquetas His. As proteínas mutantes foram: 225-460 K423Q (225KQ), 225-460 S424T(225ST), 226-460 K423Q (226KQ), 226-460 K423S (226KS), 228-460 K423Q (228KQ), 228-460 S424T (228ST), 233-460 K423Q (233KQ), 233-460 K423S (233KS), 241-460 K423Q (241KQ), 241-460 K423S (241KS), 241-460 Kdel (241Kdel), 242-460 K423Q (242KQ), 242-460 K423S (242KS) e 242-460 Kdel

(242Kdel).

[00107] As proteínas His-etiquetadas foram expressas em células HEK Freestyle™ e purificadas por cromatografia de coluna Ni-NTA. Os construtos C-terminais Tag-less foram também clonados, purificados pelo método previamente descrito (Gonzalez R et al *PNAS* 2010). Brevemente, a proteína alvo com sequência de sinal (1-16) foi clonada em um vetor de expressão de mamífero com promotor de citomegalovírus. A 96 horas após transfecção de DNA/PEI em HEK 293 Freestyle (Invitrogen), meio contendo proteína alvo secretada foi coletado e purificado por coluna Hi-Trap SP (GE Healthcare). A proteína foi eluída entre 50 mM de MES (pH 6,0), 125 mM de NaCl a 50 mM de MES (pH 6,0), 150 mM de NaCl. SDS-PAGE confirmou que a proteína purificada foi pelo menos 95% pura.

[00108] A resistência á protease foi avaliada conforme segue. A tripsinólise limitada foi realizada por incubação de 10 ng de cada proteína preparada com tripsina a razão de massa de 8000:1 (Proteína:Tripsina) por 1 hora à temperatura ambiente. A reação de tripsinólise foi, em seguida, suprimida por adição de ácido acético para trazer a reação a pH 3,0, e as amostras suprimidas foram analisadas por LC/MS. Um pico de RP HPLC de 5 min correspondente a massa dos 43 aminoácidos C-terminais (S424-E460) foi evidente para os respectivos construtos de proteína tipo selvagem. O local de clip estava no mesmo local, isto é, entre K423 e S424, conforme observado durante a produção de proteína de ANGPT3 tipo selvagem de comprimento total. Este pico estava ausente quando o Lys no local de clip site foi mudado para Gln. Cada um dos construtos de peptídeo 225KQ, 228KQ, 233KQ, 233KS, 241KQ, e 242KQ; e o peptídeo 225 tipo selvagem foram preparados e analisados. O pico correspondente à massa dos 43 aminoácidos C-terminais estava ausente quando o Lys no local de clip foi mutado para Gln, ou Ser para cada um dos construtos,

ou quando o Lys na posição 423 foi anulado.

Exemplo 2: Ensaio de ligação de integrina

[00109] **α V β 3 integrina** Peptídeos 225KQ, 228KQ, 233KQ, 241KQ e 242KQ preparados foram testados *in vitro* para ligação a α V β 3 integrina. Brevemente, placas Maxisorp foram revestidas com 2 μ g/ml de Integrina α V β 3, e várias concentrações de construto de polipeptídeo (indicadas) foram adicionadas. O peptídeo ligado foi detectado pela adição de Anti-ANGPTL3 mAb, seguido por anticorpo IgG de anti-Camundongo Cabra conjugado a peroxidase de rábano silvestre. Todos os peptídeos testados retiveram ou aperfeiçoaram a capacidade de ligação de integrina. O EC₅₀ para cada um foi determinado a partir dos dados de ligação, e os resultados são mostrados na TABELA 2.

TABELA 2: Ligação *in vitro* de ANGPTL3 e construtos de polipeptídeo projetados a Integrinas

	EC ₅₀ de α 5 β 1 integrina	EC ₅₀ de α V β 3 integrina
WT	3,054	3,245
242KQ	1,566	3,076
241KQ	2,693	4,032
233KQ	13,83	6,636
228KQ	4,26	4,051
225KQ	19,89	11,18

[00110] **α 5 β 1 integrina** Peptídeos 225KQ, 228KQ, 233KQ, 241KQ e 242KQ preparados foram testados *in vitro* para ligação a α 5 β 1 integrina. As placas foram revestidas com 2 μ g/ml conforme descrito acima, mas com Integrina α 5 β 1, e várias concentrações de construto de polipeptídeo (indicadas) foram adicionadas, e detecção efetuada conforme descrito acima. Todos os peptídeos testados retiveram ou aperfeiçoaram a capacidade de ligação de integrina. O EC₅₀ para cada um

foi determinado a partir dos dados de ligação, e os resultados são mostrados na TABELA 2.

Exemplo 3: Análise funcional de construtos

[00111] **Diferenciação e cultura de célula.** Células tronco mesenquimais derivadas de medula óssea humana primária (hMSCs) foram classificadas por FACS, e se comprovaram serem >98% positivas para CD29, CD44, CD166 e CD105, e <0,1% positivas para CD45; e células foram usadas das passagens 2-8 para experimentos. MSCs residentes de cartilagem humana (hCR-MSCs) foram derivados de condrócitos articulares primários humanos que foram separados em células únicas, clonalmente crescidas em MSCGM e validadas como MSCs através de diferenciação condrogênica, osteogênica e adipogênica. As células foram classificadas por FACS, e se comprovaram serem >98% positivas para CD166 e CD105. hCR-MSCs foram cultivados até 20 passagens com nenhuma alteração no perfil de célula, crescimento ou taxas de diferenciação identificadas.

[00112] **Condrogênese.** Construtos de peptídeo da invenção foram avaliados em ensaios físicos e funcionais para avaliar atividade de condrogênese.

[00113] Construtos projetados aqui proporcionados são derivados de ANGPTL3 que pertencem a uma família de sete proteínas de ANGPTL identificadas que têm similaridade estrutural para as angiopoietinas, mas carecem de capacidade de ligar o receptor Tie2 e, desse modo, tem funções distintas. As proteínas de ANGPTL contêm um domínio N-terminal coiled-coil (CCD), e um domínio similar a fibrinogênio C-terminal (FLD), e são acreditadas serem apertadamente reguladas por seu microambiente e interações com a matriz extracelular (ECM), tais como fibronectina e integrinas. Conklin et al., Genomics 62(3): 477-482 (1999); Goh YY, et al., Am J Pathol 177(6): 2791-2803 (2010); Goh YY, et al J Biol Chem 285(43): 32999-33009(2010). Sequências

para membros da família de ANGPTL mais proximamente relacionadas a ANGPTL3, ANGPTL1 (domínio de comprimento total e C-terminal) e ANGPTL4 (domínio de comprimento total e C-terminal) são proporcionadas na Tabela 3; e a Tabela 5B representa um alinhamento através de domínios C-terminais destes membros de família. As identidades de sequência através de domínios extracelulares e domínios C-terminais ANGPTL1, ANGPTL4, bem como outras proteínas de angiopoietina de ANGPTL7, ANGPT1 e ANGPT2, são proporcionadas na Tabela 5A. O domínio C-terminal (CT) de ANGPTL3 compartilha 37% de identidade de sequência com CT ANGPTL1, e 40% de identidade de sequência com CT ANGPTL4.

[00114] Condrogênese 2D à base de célula foi induzida *in vitro*, e ensaiada conforme descrito previamente em Johnson, K., et al., (2012) *Science* **336**, 717. Brevemente, células troncos mesenquimais derivadas de medula óssea humana primária (hMSCs) foram colocadas em meio de crescimento, em seguida, subsequentemente mudadas para um meio de estimulação condrogênico com e sem construtos.

[00115] Para formação inicialmente de nódulo de imagem, cavidades foram fixadas e manchadas com Rodamina B, onde os nódulos foram facilmente detectados pelo olho e imagens capturadas por microscopia de luz. Para facilitar a detecção à base de imagem de alta produção e quantificação, os nódulos condrogênicos foram manchados com Nile Vermelho que se liga não especificamente a colágenos. Os nódulos manchados com Nile Vermelho foram quantificados em um Acumen eX3 (dispositivo de imagem de alto teor) por excitação com um laser 488 para detecção rápida dos nódulos.

TABELA 3: Sequências da Família de ANGPTL

<u>SEQ ID</u>	<u>Construto</u>	<u>Sequência</u>
<u>71</u>	hANGPTL1 1-491	MKTFTWTLGVLFLLVDTGHCRGGQFKIKKINQ RRYPRATDGKEEAKKCAYTFLVPEQRITGPICVN TKGQDASTIKDMITRMDLENLKDVLRSRQKREIDV LQLVVDVDGNIVNEVKLLRKESRNMNSRVTQLY MQLLHEIIRKRDNSLELSQLENKILNVTTEMLKMA TRYRELEVKYASLTDLVNNQSVMITLLEEQLRIF SRQDTHVSPPLVQVVPQHIPNSQQYTPGLLGGN EIQRDPGYPRDLMPDDLATSPTKSPFKIPPVTFI NEGPFKDCQQAKEAGHSVSGIYMIKPENSNGP MQLWCENSLDPGGWTVIQKRTDGSVNFFRNWE NYKKGFGNIDGEYWLGLENIYMLSNQDNYKLLIE LEDWSDKKVYAEYSSFRLEPESEFYRLRLGTYQ GNAGDSMMWHNGKQFTTLDRDKDMYAGNCAH FHKGGWWYNACAHSNLNGVWYRGGHYRSKH QDGIFWAEYRGGSYSLRAVQMMIKPID
<u>72</u>	CT hANGPTL1 271-491	FINEGPFKDCQQAKEAGHSVSGIYMIKPENSN GPMQLWCENSLDPGGWTVIQKRTDGSVNFFR NWENYKKGFGNIDGEYWLGLENIYMLSNQDN YKLLIELEDWSDKKVYAEYSSFRLEPESEFYRL RLGTYQGNAGDSMMWHNGKQFTTLDRDKDMY AGNCAHFHKGGWWYNACAHSNLNGVWYRGG HYRSKHQDGIFWAEYRGGSYSLRAVQMMIKPID

<u>SEQ ID</u>	<u>Construto</u>	<u>Sequência</u>
<u>73</u>	hANGPTL4 1-406	MSGAPTAGAALMLCAATAVLLSAQGGPVQSKS PRFASWDEMNVLAHGLLQLGQGLREHAERTRS QLSALERRLSACGSACQGTEGSTDPLAPESR VDPEVLHSLQTQLKAQNSRIQQLFHKVAQQQ RHLEKQHLRIQHLQSQFGLLDHKHLDHEVAKP ARRKRLPEMAQPVDPAHNVSRLHRLPRDCQEL FQVGERQSGLFEIQPQGSPFLVNCKMTSDGG WTVIQRHDGSDVDFNRPWEAYKAGFGDPHGEF WLGLEKVHSITGDRNSRLAVQLRDWDGNAELLQ FSVHLGGEDTAYSLQLTAPVAGQLGATTVPPS GLSVPFSTWDQDHDLRRDKNCAKSLSGGWWFG TCSHSNLNGQYFRSIPQQRQKLKKGIFWKTWRG RYYPLQATTMLIQPMAAEAAS
<u>74</u>	CT hANGPTL4 179-406	SRLHRLPRDCQELFQVGERQSGLFEIQPQGSP PFLVNCKMTSDGGWTVIQRHDGSDVDFNRPWE AYKAGFGDPHGEFWLGLEKVHSITGDRNSRLAV QLRDWDGNAELLQFSVHLGGEDTAYSLQLTAPV AGQLGATTVPPSGLSVPFSTWDQDHDLRRDKN CAKSLSGGWWFGTCSHSNLNGQYFRSIPQQRQ KLKKGIFWKTWRGRYYPLQATTMLIQPMAAEAAS

TABELA 4: Condrogênese de proteínas de membro da família de AN-GPTL

Proteína	Atividade de Formação de Nódulo	Indução de Colágeno Tipo II	Acesso ao Banco de Genes
Angptl1	Sim	Sim	NP_004664
Angptl2	Não	n/a	NP_036230
Angptl3	Sim	Sim	NP_055310
Angptl4	Sim	Não	NP_647475
Angptl6	Não	Não	NP_114123
Angptl7	Não	Não	NP_066969
Angpt2	Não	n/a	NP_001138
Angpt1	Não	n/a	NP_004664

[00116] Condrogênese 2D à base de célula foi induzida *in vitro* e ensaiada conforme descrito previamente em Johnson, K., et al., (2012) *Science* **336**, 717. Brevemente, células tronco mesenquimais deriva-

das de medula óssea humana primária (hMSCs) foram colocadas em meio de crescimento em seguida subsequentemente mudadas a um meio de estimulação condrogênica com e sem construtos, e cultivadas por 7 ou 14 dias. As células foram, em seguida, fixadas com formaldeído, lavadas e, em seguida, manchadas usando técnicas imunocitoquímicas padrões para detectar proteínas de cartilagem primárias Pró-colágeno Tipo 2A (PIIANP) (Figura 2A) e colágeno Tipo II (Figura 2B). Para detecção de colágeno tipo II, as células foram digeridas com 0,2% de Colagenase II (Worthington Biochemical, Lakewood, NJ) que foi adicionada à solução de permeabilização. Imuno-fluorescência para cada proteína detectada foi quantificada através de imagem de alto teor (Image Express Ultra (Molecular Devices, Sunnyvale, CA)), usando certificado de classificação de célula de multi comprimento de onda, e conforme descrito previamente. Ver Figura 2. A expressão de aggrecan foi monitorado por preparação de células conforme segue: brevemente, hMSCs primários (5000 células) foram colocados em uma placa Griener de 384 cavidades. Após 24 horas, o meio de crescimento foi removido e substituído com 25 µl de DMEM contendo 1% de FBS. Os constructos de proteína foram, em seguida, adicionados à cada cavidade na dose indicada, e culturas foram crescidas a 37°C por 3 dias. As células foram fixadas com 10% de formalina, e submetidas a métodos de imunocitoquímica, para detectar expressão de proteína Aggrecan. As cavidades foram submetidas à imagem no ImageXpress Ultra, e quantificadas com certificado de classificação de célula de multi comprimento de onda, n=6/concentração de proteína. Os resultados são exemplificados na Figura 3B relativos ao controle (células estimuladas sem construto, diluente sozinho) para WT tipo selvagem C-terminal (225-460) ANGPTL3, construto projetado 242KQ ou 242Kdel, ou ANGPTL1 de comprimento total, um membro da família relacionada das proteínas de ANGPTL. Resultados similares foram vistos com ex-

perimentos usando cada um dos construtos 225WT, 225KQ, 226KQ, 228KQ, 233KQ, 241KQ e 242KQ.

[00117] Ensaios de condrogênese foram efetuados usando ensaios e métodos descritos previamente e aqui para membros da família relacionada à ANGPTL adicional. Experimentos foram efetuados para examinar se as proteínas intimamente relacionadas conferem atividade condrogênica, e se a atividade foi retida na extremidade C-terminal da proteína. ANGPTL1 e ANGPTL4 demonstraram atividade em ensaios de formação de nódulo; contudo, somente ANGPTL1 mostrou uma indução de colágeno tipo II em ensaios de condrogênese. Ver Tabela 4. Os resultados de atividade de formação de nódulo e indução de ensaios de colágeno Tipo II são resumidos na Tabela 4. A caracterização adicional de ANGPTL1 é aqui descrita. Ver outras porções deste Exemplo e Figuras 3-5.

TABELA 5: Homologia de sequência entre membros de família similares à angiopoietina humana **5A**: Identidade de sequência entre membros da família similares à angiopoietina humana (ECD ou CTD)

Membro da família	Membro da família	% de Identidade de Sequência
hANGPTL3_17-460	hANGPTL4_26-406	32,6
hANGPTL3_17-460	hANGPTL1_24-491	25,7
hANGPTL3_17-460	hANGPTL7_27-346	28,1
hANGPTL3_17-460	hANGPT1_23-498	24,1
hANGPTL3_17-460	hANGPT2_19-496	23,4
hANGPTL3_241-460	hANGPTL4_179-406	40,0
hANGPTL3_241-460	hANGPTL1_271-491	36,8
hANGPTL3_241-460	hANGPTL7_122-343	36,4
hANGPTL3_241-460	hANGPT1_277-497	37,3
hANGPTL3_241-460	hANGPT2_275-495	36,4

[00118] **5B**: Alinhamento de sequência de domínios C-terminais de membros da família similares à angiopoietina hANGPTL1(271-491)/hANGPTL3 (241-460)/hANGPTL4(179-406)

de colágeno tipo II quantificado foi confirmado para cada espécie de células avaliada.

[00121] **Condroproteção.** Construtos de peptídeo foram avaliados em ensaios funcionais para avaliar atividade condroprotetora.

[00122] Um ensaio de inibição de liberação de glicosaminoglicano *ex vivo* (GAG) (um indicador de dano de matriz) foi realizado conforme descrito em Johnson, K., et al., (2012) *Science* **336**, 717-721. Brevemente, a cartilagem bovina foi isolada, puncionada em círculos simétricos, e posta em cultura de órgão. Fatias foram tratadas por 48 horas com 20 ng/ml de TNF α e 10ng/ml de oncostatina M (OSM) (mediadores inflamatórios) para induzir degradação da matriz de cartilagem na presença ou ausência de construtos de proteína para identificar a percentagem de inibição de liberação de glicosaminoglicano (GAG). Os resultados mostrados na Figura 4A representam dados reunidos de 4 doadores, n=12 com os construtos projetados conforme indicado, e WT 225-460.

[00123] Um ensaio de inibição de óxido nítrico (NP) *in vitro* (um indicador de condro-proteção) foi realizado, conforme descrito em Johnson, K., et al., (2012) *Science* **336**, 717-721. Brevemente, os condrócitos primários foram tratados por 48 horas com construtos de proteína, conforme indicado. A reação de Greiss foi realizada, para determinar o efeito de construtos na inibição de liberação de NO, à medida que os Resultados mostrados na Figura 4B representam resultados com os construtos projetados conforme indicado, e fragmento WT C-terminal 225-460. Os resultados na Figura 4C representam os resultados com ANGPTL1 C-terminal tipo selvagem, ANGPTL3 242KQ projetada, ou controle.

[00124] **Inibição de formação de cartilagem fibrótica.** Os condrócitos articulares humanos primários foram cultivados conforme descrito acima com a adição de ácido ascórbico e a presença ou ausência de

construtos (indicado) por 14 dias para induzir hipertrofia, e expressão de colágeno tipo X foi avaliada por imunofluorescência. Os resultados mostrados na Figura 5A representam dados com construtos 225WT ou 242KQ, conforme indicado. Os resultados mostrados na Figura 5B representam dados com ANGPTL1 C-terminal tipo selvagem, ANGPTL3 242KQ ou 242Kdel projetados, ou fragmento C-terminal tipo selvagem de ANGPTL3 225-460, conforme indicado. A presença de construtos tipo selvagem ou ativos confere um efeito inibitório na formação de cartilagem fibrótica sob condições hipertróficas, conforme detectado por expressão de colágeno tipo X.

[00125] **Angiogênese.** O domínio C-terminal WT da proteína de ANGPTL3 foi reportado para ter atividades angiogênicas e propriedades *in vitro* e *in vivo* em um modelo corneal de rato. Ver Camenisch et al., J. Biol. Chem. 277(19): 17281-17290 (2002). Para determinar o risco possível de indução de novos vasos sanguíneos seguindo administração *in vivo* de ANGPTL3 C-terminal, ensaios angiogênicos *in vitro* foram examinados. Brevemente, células endoteliais de veia umbilical humanas primárias (HUVECs) foram supridas com soro durante a noite com meio de célula endotelial basal. As células foram, em seguida, etiquetadas com rastreador de célula verde, e adicionadas a placas de matrigel pré-revestidas embebidas com construto de proteína (indicado). Seguindo cultura por 18 horas na presença de ANGPTL3 de comprimento total (50 ng/mL), ou 242KQ (50ng/mL), ou bFGF (50ng/mL), que foi usada como um controle positivo, o número de pontos de ramificação e o comprimento de tubo total formado foi quantificado usando imagem de alto teor como uma medida de atividade angiogênica. Em contraste ao efeito visto na presença de ANGPTL3 de comprimento total ou controle positivo, nenhum aumento significativo em qualquer parâmetro foi detectado quando as células foram incubadas com 242KQ. Ver Figura 2C.

[00126] CR-MSCs existem dentro da cartilagem articular de hialina e aumentam em número em resposta a dano. Seguindo o dano ao tecido de cartilagem, estas células têm a capacidade de participar dos processos de reparo, mas não conduzem suficientemente a reparo correto da cartilagem em si própria. Os pacientes são, portanto, deixados com cartilagem articular que carece da capacidade correta de suportar movimentos da articulação sem dor e, frequentemente, requerem intervenção cirúrgica, e/ou uma substituição de articulação para manter sua qualidade de vida. Nós verificamos que ANGPTL3 e, em particular, peptídeos de ANGPTL3 resistentes à protease projetados têm a capacidade de direcionar a diferenciação de CR-MSCs humanos em condrócitos, especificamente secretando colágeno tipo II de proteínas de cartilagem articular de hialina e Sox9, enquanto que inibem a formação de cartilagem fibrótica notada por expressão de colágeno tipo X.

[00127] Nenhuma expressão de ANGPTL3 foi reportada a nosso conhecimento, nem observada em nossos estudos usando western blotting em condrócitos humanos, MSCs humanos, ou fibroblastos sinoviais humanos. Em articulações de roedores, pouca a nenhuma expressão foi encontrada através de imuno-histoquímica (IHC). Contudo, em fluido sinovial osteoartrítico humano (n=2), ANGPTL3 de baixo nível (1,3-6,0 ng/mL) foi detectada por ensaio imunoabsorvente ligado á enzima (ELISA), sugerindo em uma articulação comprometida, que proteína sistemicamente circulante pode entrar na atividade sinovial.

Exemplo 4: Análise in vivo de construtos

[00128] **Modelo cirúrgico de dano agudo de camundongo.** Transecção cirúrgica do ligamento cruzado anterior (ACL), ligamento tibial do menisco médio (MMTL), e ligamento colateral médio (MCL) do joelho direito de camundongos C57BL/6 (n=12/grupo) foi realizada para induzir instabilidade na articulação do joelho, e, desse modo, conduz a

um fenótipo OA, adaptado a partir do modelo previamente descrito Glasson, S.S., et al., *Osteoarthritis Cartilage* **15**, 1061 (2007). Para avaliar um benefício terapêutico potencial de tratamento com ANGPTL3, 15 semanas em seguida a cirurgia, os camundongos foram dosados intra-articularmente conforme indicado na 6A uma vez / por semana nas semanas 17-19: dose de mANGPTL3 = 200 ng / joelho. As avaliações quantitativas da placa tibial foram feitas em uma escala 0-4, 0 sendo osteoartrite normal e 5 sendo osteoartrite severa (rompimento de espessura total da cartilagem). Duas seções de cada camundongo foram cegamente avaliadas por 2 observadores independentes (Figura 6B).

[00129] O alívio de osteoartrite que induziu dor para os animais foi medido por teste de incapacitância, ou determinando a percentagem de tempo que o camundongo suportou em uma perna cirurgicamente tratada vs a perda não tratada usando um dispositivo de monitoramento de incapacitância. A Figura 7 representa os resultados de leituras, representando respostas de dor nos dias 35 e 56 após cirurgia que foram reportadas como uma % de peso suportada no membro cirúrgico versus o membro não cirúrgico. O tratamento representa os resultados de animais dosados conforme descrito acima com ANGPTL3 de murina de comprimento total (WT17-460), ou ANGPTL3 humana C-terminal (WT225-460).

[00130] **Modelo de OA crônico de camundongo (induzido por colagenase VII)** Outro modelo de animal amplamente usado de osteoartrite, o modelo de dano de articulação crônico induzido por colagenase VII, foi usado para avaliar eficácia *in vivo* de construtos. O modelo e avaliação foram realizados conforme previamente descrito. Ver van der Kraan, P.M., et al., *Am. J. Pathol.* **135**, 1001 (1989); e Johnson, K., et al., *Science* **336**, 717 (2012). Brevemente, um período de três (3) dias de inflamação é seguido por desestabilização induzida

por colagenase da articulação, resultando em destruição suave a moderada da cartilagem. A administração intra-articular de construtos foi efetuada seguindo indução no joelho uma vez/semana por três semanas, começando 3 semanas após adição de colagenase VII. Quarenta (40) dias em seguida ao tratamento, as articulações foram coletadas e seccionadas. A classificação da severidade da articulação histológica de placa femoral e tibial permitiu a quantificação do reparo do tecido. A severidade da classificação da articulação foi determinada através da classificação histológica conforme descrito acima. A Figura 8 representa o reparo com construtos 225WT, 225KQ, 228KQ, 233KQ, e 241KQ. Para confirmar a presença de proteína na articulação (retenção intra-articular de longo prazo), o tecido foi fixado e manchado para a presença do construto de proteína de WT através de imunohistoquímica. A análise confirmou a presença de proteína indicando retenção intra-articular de ANGPTL3 (com nenhum efeito visto em lipídeo/triglicerídeo, avaliado usando um painel metabólico padrão, dados não mostrados).

[00131] A análise histológica e avaliação em seções manchadas com Safranin O da placa tibial média (para detecção de proteoglicano no local de dano, conforme descrito acima) revelou regeneração na matriz de cartilagem (dados não mostrados). A análise qualitativa confirmou substituição de proteoglicanos similar a níveis vistos em um camundongo ingênuo, enquanto que os controles de veículo não mostraram substituição similar. As seções de tecido foram também manchadas conforme descrito acima para colágeno tipo II 8 semanas em seguida a injeção do dano. A análise qualitativa confirmou um aumento de colágeno tipo II em articulações tratadas com construto similares a níveis vistos em um camundongo ingênuo; enquanto que os controles tratados com veículo não mostram aumento similar (dados não mostrados).

Modelo de desgaste de menisco de rato

[00132] Um modelo de dano cirúrgico de rato foi também usado para avaliar eficácia *in vivo* de construtos. O modelo e avaliação foi inicialmente realizado conforme previamente descrito Gerwin N. et al. *Osteoarthritis Cartilage*. **Suppl 3**: S24 (2010). Brevemente, a pele foi raspada em uma articulação do joelho, e ligamento colateral médio (MCL) foi isolado através de uma incisão, e o MCL foi estabilizado, e um corte distal do menisco feito usando um escalpe. Nas semanas 1, 2 e 3 em seguida à cirurgia, construto de proteína ou controle de veículo foi injetado intra-articular mente, em seguida, as articulações foram coletadas e seccionadas em 4 e 6 semanas após cirurgia. A classificação de severidade de articulação histológica de placa femoral e tibial foi realizada para quantificação do reparo de tecido, conforme descrito acima. O dado é mostrado para a análise de 6 semanas.

[00133] Cartilagem de hialina saudável substitui dano em seguida ao tratamento. A análise e classificação histológica da placa tibial lateral de cartilagem manchada com safranin O foram realizadas conforme descrito acima e quantificadas. Os Resultados demonstram que animais tratados com construto 242KQ revelaram regeneração em matriz de cartilagem e substituição de proteoglicanos similares a níveis vistos em um rato ingênuo, enquanto que os controles de veículo não mostraram substituição similar. Ver Figura 9. Resultados similares foram vistos com 225WT.

[00134] Um modelo de desgaste de menisco cirurgicamente induzido levemente alterado daquele acima descrito foi usado para iniciar dano de cartilagem em ratos Lewis machos de modo a testar a eficácia de 242KQ na promoção de reparo de cartilagem *in vivo*. A cirurgia em ratos foi realizada para cortar completamente o ligamento colateral médio e o menisco medial para desestabilizar a articulação de modo que suporte de peso futuro conduziria a rápida degeneração da carti-

lagem. Uma incisão foi feita para cortar o ligamento em ambos os lados da agulha, assegurando, desse modo, um corte completo. Uma lâmina de bisturi foi, em seguida, usada para deslizar sob o ligamento patelar no espaço sinovial, e a ponta afiada foi usada para cortar o menisco. Um corte bem sucedido foi efetuado quando a articulação se desloca lateralmente. Uma semana após cirurgia, os ratos foram dosados por injeção intra-articular de 242KQ ou salina em um volume de 25 uL no espaço sinovial intra-articular.

[00135] Vinte e oito dias após cirurgia de desgaste do menisco e vinte e um dias de injeção pós intra-articular de salina ou construto, os animais do estudo foram eutanizados, e as articulações afetadas foram coletadas para análise, fixadas em 10% de formalina em PBS, descalcificadas com ácido fórmico, e embebidas em parafina antes de secionamento. Seções coronais foram cortadas e manchadas por Safrazinha O, ou deixadas para manchamento de imuno-histoquímico futuro. A análise revelou que a placa tibial média tem a maior quantidade de dano de cartilagem, e foi decidido avaliar somente esta área da articulação para eficácia de 242KQ. Usando o sistema de classificação de OARSI, as classificações de severidade da cartilagem foram verificadas para seis seções através da largura da cartilagem da tíbia para cada animal (N=10) em uma maneira blindada. A classificação foi feita duas vezes em pontos de tempo diferentes, e as classificações foram, em seguida, projetadas na média para criar uma classificação de dano de cartilagem. Adicionalmente, análises de classificação objetivas foram realizadas com um certificado de costume gerado em Matlab. O algoritmo identifica as superfícies da cartilagem articular e parâmetros de cartilagem objetivamente quantificados adicionais (análises zonais, intensidade de safranin O, área de cartilagem, espessura da cartilagem). Os resultados são representados na Figura 10A.

[00136] O reparo estrutural de cartilagem não está sempre associa-

do com alívio de dor, pelo menos em humanos. Embora a fisiologia e marcha do roedor sejam significativamente diferentes da dos humanos, 242KQ foi avaliado para determinar se existe qualquer aperfeiçoamento na marcha ou comprimento de tempo gasto no membro cirúrgico após tratamento. O monitoramento da incapacitância foi realizado em ratos tratados com 242KQ. Os ratos foram submetidos a cirurgia de menisco modificada, conforme descrito acima. Uma semana em seguida a cirurgia, 242KQ foi injetado no espaço sinovial. No dia 28, os ratos foram colocados em um monitor de incapacitância em seus membros posteriores e 30 leituras subsequentes foram tomadas por 10 minutos para cada rato para determinar a percentagem de tempo gasto (distribuição de peso) em cada membro posterior. Estes dados dão uma indicação da redistribuição de peso induzida por dor. Foi determinado que no modelo de desgaste de menisco do rato, o tratamento com 242KQ uma semana em seguida à cirurgia conduziu a uma restauração parcial da capacidade de suporte de peso igual dos ratos. Ver Figura 10B.

[00137] Um dos suportes primários durante reparo de cartilagem espontâneo ou cirúrgico é a substituição de cartilagem articular de hialina com cartilagem fibrótica. Para explorar o tipo de reparo de cartilagem mediada por ANGPTL3, seções a partir dos joelhos de rato coletadas a partir do estudo de desgaste do menisco do rato realizadas acima foram manchadas pela presença de colágeno tipo II (para indicar cartilagem articular de hialina) e colágeno tipo X (para indicar cartilagem fibrótica). Após uma injeção única de 20 µg de 242KQ, existe uma redução qualitativa na quantidade de expressão de colágeno tipo X.

[00138] Retenção de longo prazo de 242KQ em seguida a injeção intravenosa e intra-articular em joelho de rato foi determinada através de etiquetagem ¹²⁴I de proteína, e administração, seguida por PET /

imagem de uCT para monitorar retenção. Ver, Gerwin, N., et al. (2006) *Advanced drug delivery reviews* **58**, 226-242. O tempo de residência médio (MRT) após injeção IA de 242KQ na articulação foi determinado para ser ~17,3 horas, que é significativamente aumentado sobre o padrão 2-3 horas reportado (Ver TABELA 6)

TABELA 6: Persistência de ¹²⁴I 242KQ

Rota	Dose (µg)	C _{máx} (µg/mL)	AUC _{0-inf} (hr*µg/mL)	CL (mL/h)	Vss (mL)	MRT (h)	T _{1/2} (h)
IV	164,2	129,3	22,1	7,4	53,4	7,2	12,4
IA	38,3	0,2	1,9	-	-	17,3	7,2

[00139] **Modelo de dano da articulação de menisectomia parcial de cão** Nós também avaliamos a atividade de ANGPTL3 em modelo de dano da articulação canino. O modelo foi realizado, e avaliações realizadas conforme descrito em Connor, J.R., et al., *Osteoarthritis and cartilage / OARS, Osteoarthritis Research Society* **17**, 1236-1243 (2009). Brevemente, a pele foi raspada em uma articulação do joelho, e o ligamento colateral médio (MCL) foi isolado através de uma incisão, e o MCL foi estabilizado, e um corte distal do menisco feito usando um escalpe. Quatro (4) dias em seguida à cirurgia, os animais receberam, ou dosagem duas vezes semanalmente (1,5 ug ou 15 ug), ou uma dose única (30 ug) do construto de proteína (ANGPTL3 canina de comprimento total) no dia 7 ou controle de veículo (injetado intra-articularmente). Os cães foram eutanizados no dia 28, e os joelhos foram submetidos a seccionamento e classificação histológica, conforme descrito acima para os experimentos com rato e camundongo. A Figura 10 representa a Classificação grosseira total do reparo associado com tratamento de ANGPTL3 canina. Após classificação e avaliação histológica das seções de articulação do cão manchadas com Safranin O, as áreas onde a perda de cartilagem mais severa ocorre nos grupos de salina foi a porção da articulação que tem a maior redução na área de lesão em seguida a uma dose única de 30 µg de cANGPTL3.

[00140] É compreendido que os exemplos e concretizações aqui descritos são para proposta ilustrativa, e que várias modificações ou mudanças à luz destes serão sugeridas àqueles técnicos no assunto, e são para serem incluídas dentro do espírito e âmbito deste pedido e escopo das reivindicações em anexo.

SEQUÊNCIAS

SEQ ID	Construto	Sequência
1	<u>ANGPTL3</u> <u>Humana</u>	MFTIKLLL FIVPLVISSRIDQDNSSFDSL SPEPKSRFAMLDVVKILANGLLQL GHGLKDFVHKTKGQINDIFQKLNIFDQSFYDLSLQTSEIKEEKELRRTTYK LQVKNEEVKNMSLELNSKLESLLLEEKILLQKVKYLEEQLTNLIQNQPETPE HPEVTSKTFVEKQDNSIKDLLQTVEDQYKQLNQHSQIKEIENQLRRTSI QEPTEISLSSKPRAPRTPPLFLQNEIRNVKHDGIPAECTTIYNRGEHTSGMY AIRPSNSQV FHVYCDVISGSPWTLIQHRIDGSQNFNETWENYKYGFGRLD GEFWLGLEKIYSIVKQSNYVLRLELEDWKNKHIEYSFYLGHNHETNYTLHL VAITGNVPNAIPENKDLV FSTWDHKAKGHFNCP EGYSGGWVWHDECGE NNLNGKYNK PRAKSKPERRRGLSWKSQNGRLYSIKSTKMLIHPTDSESEFE
2	<u>ANGPTL3</u> <u>Humana</u> <u>REFSEQ</u>	ttcagaagaaaacagtccacgttgctgaaattgaaaatcaagataaaaatgttcacaattaagctcctt cttttattgtcctctagttatttctccagaattgatcaagacaattcatcatttgattctctatccagagcca aatcaagattgctatgtagacgatgtaaaaatttagccaatggcctcctcagttgggacatggctta aagacttgtccataagacgaaggccaaataatgacataattcaaaaactcaacataattgatcagctctt ttatgatctatcgctgcaaacacagtgaaatcaagaagaagaaaaggaactgagaagaactacatata aactacaagtcaaaaatgaagaggtaaagaatatgactgaactcaactcaaaaactgaaagcctcc tagaagaaaaatctactcaacaaaaagtgaaatattagaagagcaactaactaactaattcaaaa tcaacctgaaactccagaacaccagaagtaactcacttaaaaactttgtgaaaaacaagataatag catcaagaccttctccagaccgtggaagaccaataaaacaattaacacacagcatagtcaataa aagaatagaaaatcagctcagaaggactagtattcaagaaccacagaaatttctctatctccaagc caagagcaccaagaactactccttctcagttgaaatgaataagaatgtaaaacatgatggcattcct gctgaatgtaccaccattataacagaggtgaacatacaagtgcatgatgccatcagaccagcaac tccaagttttcagctactgtgatgtatatacaggtatccatggacattaatcaacatcgaatagatgga tcacaaaactcaatgaaactgggagaactcaaatatggtttggaggctgatgagaatgttgggtg ggcctagagaagataatacctcagtagtaagcaatcaattatggtttacgaattgagttggaagactgga agacaacaacattatattgaatattctttactgggaaatcacgaaaccaactatacgctacatctagtt gcgattactggcaatgtcccaatgcaatccggaaaacaagatttgggtttctacttgggatcaca agcaaaaggacactcaactgccagaggttattcaggaggctggtggtgcatgatgatggtggaga aaacaacctaaatgtaataatacaaaaccaagagcaaaatcaagccagagaggagaagaggatt atcttgaagtctcaaatggaaggtatactataaaatcaacaaaatgttgatccatccaacagattc agaagcttgaatgaactgaggcaaataaaggaataatcaacataacactcaatccaagttcaat gtggtctaataatctggtattaaatcctaagagaagcctgagaatagattttttatctaaagtcactg tatttaagattaacatacaatcacataacctaaagaataaccgtttacatttcaatcaaaattctataata ctatttggtttaaatgtgatgtgggaatcaatttagatggtcacaatctagattataatcaataggtgact attaataactttctaaataaaaaatttagagactttatttaaaaggcatcatatgagtaataatcaact ttcccagtttaaaaaactgactctgtttaaactctaaactgactaaatacagaggactgtaattgtac agttctaaatgttagtatttaattcaaaaactaaaatcgtcagcacagagatgtgtaaaaatctgtaata caatttttaactgatgctcatttctcaaaaataattggagtaaatgttgatgatttattatgaaacct aatgaagcagaataaataactgtattaaataagttcgtctttaaacaatggagatgactactaagtc acattgactttaacatgaggtatcactataccttatt
3	<u>ANGPTL3</u> <u>de Murina</u>	MHTIKLFLFVPLVIASRVDPDLSSFD SAPSEPKSRFAMLDVVKILANGLLQL LGHGLKDFVHKTKGQINDIFQKLNIFDQSFYDLSLRNTEIKEEKELRRRTS TLQVKNEEVKNMSVELNSKLESLLLEEKALQHKVRALEEQLTNLILSPAGA QEHPEVTSKSFVEKQDNSIRELLQSVVEYKQLSQQHMQIKEIEKQLRKT GIQEPSENSLSSKRAPRTPPLQLNETENTEQDDLPADCSAVYNNRGEHT SGVYTIKPRNSQGFNVYCDTQSGSPWTLIQHRKIDGSQDFWENYKKG FGRLDGEFWLGLEKIYIVQSNYILRLELQDWKDSKHVEYSFHLGSHET NYTLHVAEIAIGNIPGALPEHTDLMFSTWNHRAKGLYCPESYSGGWVWN DICGENNLNGKYNKPRTKSRPERRRGIYWRPQSRKLYAIKSSKMLLQPTT

SEQ ID	Construto	Sequência
4	<u>ANGPTL3</u> <u>Canina</u>	MYTIKLFLLFIPLVISSKIDRDYSSYDSVSPEPKSRFAMLDVVKILANGLLQLG HGLKDFVHKTKGQINDIFQKLNIFDQSFYDLSLQTNEIKEEEKELRRRTTSKL QVKNEEVKNMSLELNSKVESLLEEKILLQQKVRYLEKQLTSLIKNQPEIQEH PEVTSKTFVEQQDNSIKDLLQTVEEQYRQLNQQHSQIKEIENQLRNVQIE STENSLSSKPRAPRTTPFHLNETKNVEHNDIPANCTTIYNRGEHTSGIYSI RPSNSQVFNVCYDVKSGSSWTLIQHRIDGSQNFNETWENYRYGFGRLDG EFWLGLEKIYSIVKQSNYILRIELEDWVNDKNHYIEYFFHLGNHETNYTLHLV EITGNILNALPEHKDLVFSTWDHKAKGHVNCPESSYSGGWWWHNVCGEN NLNGKYNKQRAKTKPERRRGLYWKSQNGRLYSIKSTKMLIHPIDSESSE
5	<u>ANGPTL3</u> <u>Equina</u>	MYTIKLFLLVIAPLVISSRIDQDYSSLDISPEPKSRFAMLDVVKILANGLLQLG HGLKDFVHKTKGQINDIFQKLNIFDQSFYALSQTNEIKEEEKELRRRTTSKL QVKNEEVKNMSLELNSKLESLLLEEKILLQQKVRYLEEQTLKLIKNQPEIQE HPEVTSKTFVEQQDNSIKDLLQTMEEQYRQLNQQHSQIKEIENQLRRTGI QESTENSLSSKPRAPRTTPSFHLNETKDVEHDDFPADCTTIYNRGEHTSGI YSIKPSNSQVFNVCYDVISGSSWILIQRRIDGSQNFNETWQNYKYGFGRLD FEFWLGLEKIYSIVKRSNYILRIELEDWVNDKNHTIEYSFHLGNHETNYTLHLV EITGNVNPALPEHKDLVFSTWDHKAKGQLNCLESYSGGWWWHVDCGGD NPNGKYNKPRSKTKPERRRGICWKSQNGRLYTIKSTKMLIHPIDSESEFELR QIKKPMN
6	<u>ANGPTL3</u> <u>Bovina</u>	MYTIKLFLLIAPLVISSRTDQDYTSLDSISPEPKSRFAMLDVVKILANGLLQLG HGLKDFVHKTKGQINDIFQKLNIFDQSFYDLSLQTNEIKEEEKELRRRTTSKL QVKNEEVKNMSLELDSKLESLLLEEKILLQQKVRYLEDQLTDLIKNQPEIQEY LEVTSKTLVEQQDNSIKDLLQIVEEQYRQLNQQHSQIKEIENQLRRTGIKE STEISLSSKPRAPRTTPSFHNETKNVEHDDIPADCTIYNQKGHTSGIYSIR PSNSQVFNVCYDVKSGSSWTLIQHRIDGSQNFNETWENYKYGFGRLDGE FWLGLEKIYSIVMQSNYILRIELEDWVNDKDYTYEYSFHLGDHETNYTLHLAEI SGNGPKAFPEHKDLMFSTWDHKAKGHFNCPESSYSGGWWYHDCVCGENN LNGKYNKPKAKAKPERKEGICWKSQDGRLYSIKATKMLIHPDSENSE
7	<u>207-455WT</u>	IQEPTAISLSSKPRAPRTTPFLQLNEIRNVKHDGIPAECTTIYNRGEHTSGM YAIRPSNSQVFNVCYDVISGSPWTLIQHRIDGSQNFNETWENYKYGFGRLD DGEFWLGLEKIYSIVKQSNYVLRILELEDWVNDKNHYIEYSFYLGHNHETNYTL HLVAITGNVNPNAIPENKDLVFSTWDHKAKGHFNCPEGYSGGWWWHDEC GENNLNGKYNKPRASKPERRRGLSWKSQNGRLYSIKSTKMLIHPTD
8	<u>225-455WT</u>	TTPFLQLNEIRNVKHDGIPAECTTIYNRGEHTSGMYAIRPSNSQVFNVCYD VISGSPWTLIQHRIDGSQNFNETWENYKYGFGRLDGEFWLGLEKIYSIVKQ SNYVLRILELEDWVNDKNHYIEYSFYLGHNHETNYTLHLVAITGNVNPNAIPENK LVFSTWDHKAKGHFNCPEGYSGGWWWHDECENNLNGKYNKPRASK PERRRGLSWKSQNGRLYSIKSTKMLIHPTD
9	<u>228-455WT</u>	FLQLNEIRNVKHDGIPAECTTIYNRGEHTSGMYAIRPSNSQVFNVCYDVIS GSPWTLIQHRIDGSQNFNETWENYKYGFGRLDGEFWLGLEKIYSIVKQSN YVLRILELEDWVNDKNHYIEYSFYLGHNHETNYTLHLVAITGNVNPNAIPENKDLV FSTWDHKAKGHFNCPEGYSGGWWWHDECENNLNGKYNKPRASKPE RRRGLSWKSQNGRLYSIKSTKMLIHPTD
10	<u>233-455WT</u>	EIRNVKHDGIPAECTTIYNRGEHTSGMYAIRPSNSQVFNVCYDVISGSPWT LIQHRIDGSQNFNETWENYKYGFGRLDGEFWLGLEKIYSIVKQSNYVLRILE LEDWVNDKNHYIEYSFYLGHNHETNYTLHLVAITGNVNPNAIPENKDLVFSTWD HKAKGHFNCPEGYSGGWWWHDECENNLNGKYNKPRASKPERRRGL SWKSQNGRLYSIKSTKMLIHPTD
11	<u>241-455WT</u>	GIPAECTTIYNRGEHTSGMYAIRPSNSQVFNVCYDVISGSPWTLIQHRIDG SQNFNETWENYKYGFGRLDGEFWLGLEKIYSIVKQSNYVLRILELEDWVND KNHYIEYSFYLGHNHETNYTLHLVAITGNVNPNAIPENKDLVFSTWDHKAKGHF NCEGYSGGWWWHDECENNLNGKYNKPRASKPERRRGLSWKSQNGRLYSIKSTKMLIHPTD
12	<u>ANGPTL3K</u> <u>Q</u>	MFTIKLLLFIPLVISSRIDQDNSSFDLSPEPKSRFAMLDVVKILANGLLQL GHGLKDFVHKTKGQINDIFQKLNIFDQSFYDLSLQTSEIKEEEKELRRRTTYK LQVKNEEVKNMSLELNSKLESLLLEEKILLQQKVRYLEEQTLNLIQNQPETPE HPEVTSKTFVEKQDNSIKDLLQTVEDQYKQLNQQHSQIKEIENQLRRTSI QEPTEISLSSKPRAPRTTPFLQLNEIRNVKHDGIPAECTTIYNRGEHTSGMY AIRPSNSQVFNVCYDVISGSPWTLIQHRIDGSQNFNETWENYKYGFGRLD GEFWLGLEKIYSIVKQSNYVLRILELEDWVNDKNHYIEYSFYLGHNHETNYTLHL VAITGNVNPNAIPENKDLVFSTWDHKAKGHFNCPEGYSGGWWWHDECCE NNLNGKYNKPRASKPERRRGLSWKSQNGRLYSIKSTKMLIHPTDSESEFE

SEQ ID	Construto	Sequência
<u>13</u>	<u>ANGPTL3KS</u>	MFTIKLLL FIVPLVISSRIDQDNSSFDLSLSPKSRFAMLDDVKILANGLLQL GHGLKDFVHKTKGQINDIFQKLNIFDQSFYDL SLQTSEIKEEELRRTTYK LQVKNEEVKNMSLELNSKLESLL EEKILLQQKVYLEEQLTNLIQNQPETPE HPEVTSKTFVEKQDNSIKDLLQTVEDQYKQLNQHSQIKEIENQLRRTSI QEPTAISLSSKPRAPRTTPFLQLNEIRNVKHDGIPAECTTIYNRGEHTSGMY AIRPSNSQVFHVYCDVISGSPWTLIQHRIDGSQNFNETWENYKYGFGRDL GEFWLGLEKIYSIVKQSNYVLRIELEDWKNKHIEYSFYLGNETNYTLHL VAITGNVPNAIPENKDLVFSTWDHKAKGHFNCPGYSGGWWWHDECCE NNLNGKYNKPRASSKPERRRGLSWKSQNGRLYSIKSTKMLIHPTDSESEFE
<u>14</u>	<u>207KQ</u>	IQEPTAISLSSKPRAPRTTPFLQLNEIRNVKHDGIPAECTTIYNRGEHTSGM YAIRPSNSQVFHVYCDVISGSPWTLIQHRIDGSQNFNETWENYKYGFGRDL DGEFWLGLEKIYSIVKQSNYVLRIELEDWKNKHIEYSFYLGNETNYTL HLVAITGNVPNAIPENKDLVFSTWDHKAKGHFNCPGYSGGWWWHDEC GENNLNGKYNKPRASSKPERRRGLSWKSQNGRLYSIKSTKMLIHPTDSE SFE
<u>15</u>	<u>207KS</u>	IQEPTAISLSSKPRAPRTTPFLQLNEIRNVKHDGIPAECTTIYNRGEHTSGM YAIRPSNSQVFHVYCDVISGSPWTLIQHRIDGSQNFNETWENYKYGFGRDL DGEFWLGLEKIYSIVKQSNYVLRIELEDWKNKHIEYSFYLGNETNYTL HLVAITGNVPNAIPENKDLVFSTWDHKAKGHFNCPGYSGGWWWHDEC GENNLNGKYNKPRASSKPERRRGLSWKSQNGRLYSIKSTKMLIHPTDSESE FE
<u>16</u>	<u>225KQ</u>	TTPFLQLNEIRNVKHDGIPAECTTIYNRGEHTSGMYAIRPSNSQVFHVYCD VISGSPWTLIQHRIDGSQNFNETWENYKYGFGRDLGGEFWLGLEKIYSIVKQ SNYVLRIELEDWKNKHIEYSFYLGNETNYTLHLVAITGNVPNAIPENKDL LVFSTWDHKAKGHFNCPGYSGGWWWHDECENNLNGKYNKPRASSK PERRRGLSWKSQNGRLYSIKSTKMLIHPTDSESEFE
<u>17</u>	<u>225KS</u>	TTPFLQLNEIRNVKHDGIPAECTTIYNRGEHTSGMYAIRPSNSQVFHVYCD VISGSPWTLIQHRIDGSQNFNETWENYKYGFGRDLGGEFWLGLEKIYSIVKQ SNYVLRIELEDWKNKHIEYSFYLGNETNYTLHLVAITGNVPNAIPENKDL LVFSTWDHKAKGHFNCPGYSGGWWWHDECENNLNGKYNKPRASSK PERRRGLSWKSQNGRLYSIKSTKMLIHPTDSESEFE
<u>18</u>	<u>225ST</u>	TTPFLQLNEIRNVKHDGIPAECTTIYNRGEHTSGMYAIRPSNSQVFHVYCD VISGSPWTLIQHRIDGSQNFNETWENYKYGFGRDLGGEFWLGLEKIYSIVKQ SNYVLRIELEDWKNKHIEYSFYLGNETNYTLHLVAITGNVPNAIPENKDL LVFSTWDHKAKGHFNCPGYSGGWWWHDECENNLNGKYNKPRAKTK PERRRGLSWKSQNGRLYSIKSTKMLIHPTDSESEFE
<u>19</u>	<u>226KQ</u>	TPFLQLNEIRNVKHDGIPAECTTIYNRGEHTSGMYAIRPSNSQVFHVYCDVI SGSPWTLIQHRIDGSQNFNETWENYKYGFGRDLGGEFWLGLEKIYSIVKQS NYVLRIELEDWKNKHIEYSFYLGNETNYTLHLVAITGNVPNAIPENKDL VFSTWDHKAKGHFNCPGYSGGWWWHDECENNLNGKYNKPRASSK ERRRGLSWKSQNGRLYSIKSTKMLIHPTDSESEFE
<u>20</u>	<u>226KS</u>	TPFLQLNEIRNVKHDGIPAECTTIYNRGEHTSGMYAIRPSNSQVFHVYCDVI SGSPWTLIQHRIDGSQNFNETWENYKYGFGRDLGGEFWLGLEKIYSIVKQS NYVLRIELEDWKNKHIEYSFYLGNETNYTLHLVAITGNVPNAIPENKDL VFSTWDHKAKGHFNCPGYSGGWWWHDECENNLNGKYNKPRASSK ERRRGLSWKSQNGRLYSIKSTKMLIHPTDSESEFE
<u>21</u>	<u>228KQ</u>	FLQLNEIRNVKHDGIPAECTTIYNRGEHTSGMYAIRPSNSQVFHVYCDVIS GSPWTLIQHRIDGSQNFNETWENYKYGFGRDLGGEFWLGLEKIYSIVKQSN YVLRIELEDWKNKHIEYSFYLGNETNYTLHLVAITGNVPNAIPENKDLV FSTWDHKAKGHFNCPGYSGGWWWHDECENNLNGKYNKPRASSKPE RRRGLSWKSQNGRLYSIKSTKMLIHPTDSESEFE
<u>22</u>	<u>228KS</u>	FLQLNEIRNVKHDGIPAECTTIYNRGEHTSGMYAIRPSNSQVFHVYCDVIS GSPWTLIQHRIDGSQNFNETWENYKYGFGRDLGGEFWLGLEKIYSIVKQSN YVLRIELEDWKNKHIEYSFYLGNETNYTLHLVAITGNVPNAIPENKDLV FSTWDHKAKGHFNCPGYSGGWWWHDECENNLNGKYNKPRASSKPE RRRGLSWKSQNGRLYSIKSTKMLIHPTDSESEFE
<u>23</u>	<u>228ST</u>	FLQLNEIRNVKHDGIPAECTTIYNRGEHTSGMYAIRPSNSQVFHVYCDVIS GSPWTLIQHRIDGSQNFNETWENYKYGFGRDLGGEFWLGLEKIYSIVKQSN YVLRIELEDWKNKHIEYSFYLGNETNYTLHLVAITGNVPNAIPENKDLV FSTWDHKAKGHFNCPGYSGGWWWHDECENNLNGKYNKPRAKTKPE RRRGLSWKSQNGRLYSIKSTKMLIHPTDSESEFE

SEQ ID	Construto	Sequência
<u>24</u>	<u>233KQ</u>	EIRNVKHDGIPAECTTIYNRGEHTSGMYAIRPSNSQVFHVYCDVISGSPWT LIQHRIDGSQNFNETWENYKYGFGRLDGEFWLGLEKIYSIVKQSNYVLRIE LEDWKDNKHIEYSFYLGNETNYTLHLVAITGNVPNAIPENKDLVFSTWD HKAKGHFNCPEGYSGGWWWHDECENNLNGKYNKPRASQSPERRRGL SWKSQNGRLYSIKSTKMLIHPTDSESEFE
<u>25</u>	<u>233KS</u>	EIRNVKHDGIPAECTTIYNRGEHTSGMYAIRPSNSQVFHVYCDVISGSPWT LIQHRIDGSQNFNETWENYKYGFGRLDGEFWLGLEKIYSIVKQSNYVLRIE LEDWKDNKHIEYSFYLGNETNYTLHLVAITGNVPNAIPENKDLVFSTWD HKAKGHFNCPEGYSGGWWWHDECENNLNGKYNKPRASSKPERRRGL SWKSQNGRLYSIKSTKMLIHPTDSESEFE
<u>26</u>	<u>241KQ</u>	GIPAECTTIYNRGEHTSGMYAIRPSNSQVFHVYCDVISGSPWT LIQHRIDGSQNFNETWENYKYGFGRLDGEFWLGLEKIYSIVKQSNYVLRIE LEDWKDNKHIEYSFYLGNETNYTLHLVAITGNVPNAIPENKDLVFSTWD HKAKGHFNCPEGYSGGWWWHDECENNLNGKYNKPRASQSPERRRGL SWKSQNGRLYSIKSTKMLIHPTDSESEFE
<u>27</u>	<u>241KS</u>	GIPAECTTIYNRGEHTSGMYAIRPSNSQVFHVYCDVISGSPWT LIQHRIDGSQNFNETWENYKYGFGRLDGEFWLGLEKIYSIVKQSNYVLRIE LEDWKDNKHIEYSFYLGNETNYTLHLVAITGNVPNAIPENKDLVFSTWD HKAKGHFNCPEGYSGGWWWHDECENNLNGKYNKPRASSKPERRRGL SWKSQNGRLYSIKSTKMLIHPTDSESEFE
<u>28</u>	<u>242KQ</u>	IPAECTTIYNRGEHTSGMYAIRPSNSQVFHVYCDVISGSPWT LIQHRIDGSQNFNETWENYKYGFGRLDGEFWLGLEKIYSIVKQSNYVLRIE LEDWKDNKHIEYSFYLGNETNYTLHLVAITGNVPNAIPENKDLVFSTWD HKAKGHFNCPEGYSGGWWWHDECENNLNGKYNKPRASQSPERRRGL SWKSQNGRLYSIKSTKMLIHPTDSESEFE
<u>29</u>	<u>242KS</u>	IPAECTTIYNRGEHTSGMYAIRPSNSQVFHVYCDVISGSPWT LIQHRIDGSQNFNETWENYKYGFGRLDGEFWLGLEKIYSIVKQSNYVLRIE LEDWKDNKHIEYSFYLGNETNYTLHLVAITGNVPNAIPENKDLVFSTWD HKAKGHFNCPEGYSGGWWWHDECENNLNGKYNKPRASSKPERRRGL SWKSQNGRLYSIKSTKMLIHPTDSESEFE
<u>30</u>	<u>225-455KQ</u>	TTPFLQLNEIRNVKHDGIPAECTTIYNRGEHTSGMYAIRPSNSQVFHVYCD VISGSPWT LIQHRIDGSQNFNETWENYKYGFGRLDGEFWLGLEKIYSIVKQ SNYVLRIELEDWKDNKHIEYSFYLGNETNYTLHLVAITGNVPNAIPENK DLVFSTWDHKAKGHFNCPEGYSGGWWWHDECENNLNGKYNKPRASQ SPERRRGLSWKSQNGRLYSIKSTKMLIHPTD
<u>31</u>	<u>225-455KS</u>	TTPFLQLNEIRNVKHDGIPAECTTIYNRGEHTSGMYAIRPSNSQVFHVYCD VISGSPWT LIQHRIDGSQNFNETWENYKYGFGRLDGEFWLGLEKIYSIVKQ SNYVLRIELEDWKDNKHIEYSFYLGNETNYTLHLVAITGNVPNAIPENK DLVFSTWDHKAKGHFNCPEGYSGGWWWHDECENNLNGKYNKPRASSK PERRRGLSWKSQNGRLYSIKSTKMLIHPTD
<u>32</u>	<u>226-455KQ</u>	TPFLQLNEIRNVKHDGIPAECTTIYNRGEHTSGMYAIRPSNSQVFHVYCD VISGSPWT LIQHRIDGSQNFNETWENYKYGFGRLDGEFWLGLEKIYSIVKQ SNYVLRIELEDWKDNKHIEYSFYLGNETNYTLHLVAITGNVPNAIPENK DLVFSTWDHKAKGHFNCPEGYSGGWWWHDECENNLNGKYNKPRASQ SPERRRGLSWKSQNGRLYSIKSTKMLIHPTD
<u>33</u>	<u>226-455KS</u>	TPFLQLNEIRNVKHDGIPAECTTIYNRGEHTSGMYAIRPSNSQVFHVYCD VISGSPWT LIQHRIDGSQNFNETWENYKYGFGRLDGEFWLGLEKIYSIVKQ SNYVLRIELEDWKDNKHIEYSFYLGNETNYTLHLVAITGNVPNAIPENK DLVFSTWDHKAKGHFNCPEGYSGGWWWHDECENNLNGKYNKPRASSK PERRRGLSWKSQNGRLYSIKSTKMLIHPTD
<u>34</u>	<u>228-455KQ</u>	FLQLNEIRNVKHDGIPAECTTIYNRGEHTSGMYAIRPSNSQVFHVYCD VISGSPWT LIQHRIDGSQNFNETWENYKYGFGRLDGEFWLGLEKIYSIVKQ SNYVLRIELEDWKDNKHIEYSFYLGNETNYTLHLVAITGNVPNAIPENK DLVFSTWDHKAKGHFNCPEGYSGGWWWHDECENNLNGKYNKPRASQ SPERRRGLSWKSQNGRLYSIKSTKMLIHPTD
<u>35</u>	<u>228-455KS</u>	FLQLNEIRNVKHDGIPAECTTIYNRGEHTSGMYAIRPSNSQVFHVYCD VISGSPWT LIQHRIDGSQNFNETWENYKYGFGRLDGEFWLGLEKIYSIVKQ SNYVLRIELEDWKDNKHIEYSFYLGNETNYTLHLVAITGNVPNAIPENK DLVFSTWDHKAKGHFNCPEGYSGGWWWHDECENNLNGKYNKPRASSK PERRRGLSWKSQNGRLYSIKSTKMLIHPTD

SEQ ID	Construto	Sequência
<u>36</u>	<u>233-455KQ</u>	EIRNVKHDGIPAECTTIYNRGEHTSGMYAIRPSNSQVFHVYCDVISGSPWT LIQHRIDGSQNFNETWENYKYGFGRLDGEFWLGLEKIYSIVKQSNYVLRIE LEDWKDNKHIEYSFYLGNETNYTLHLVAITGNVPNAIPENKDLVFSTWD HKAKGHFNCPEGYSGGWWWHDECENNLNGKYNKPRASQSPERRRGL SWKSQNGRLYSIKSTKMLIHPTD
<u>37</u>	<u>233-455KS</u>	EIRNVKHDGIPAECTTIYNRGEHTSGMYAIRPSNSQVFHVYCDVISGSPWT LIQHRIDGSQNFNETWENYKYGFGRLDGEFWLGLEKIYSIVKQSNYVLRIE LEDWKDNKHIEYSFYLGNETNYTLHLVAITGNVPNAIPENKDLVFSTWD HKAKGHFNCPEGYSGGWWWHDECENNLNGKYNKPRASSKPERRRGL SWKSQNGRLYSIKSTKMLIHPTD
<u>38</u>	<u>241-455KQ</u>	GIPAECTTIYNRGEHTSGMYAIRPSNSQVFHVYCDVISGSPWT LIQHRIDGSQNFNETWENYKYGFGRLDGEFWLGLEKIYSIVKQSNYVLRIE LEDWKDNKHIEYSFYLGNETNYTLHLVAITGNVPNAIPENKDLVFSTWD HKAKGHFNCPEGYSGGWWWHDECENNLNGKYNKPRASQSPERRRGL SWKSQNGRLYSIKSTKMLIHPTD
<u>39</u>	<u>241-455KS</u>	GIPAECTTIYNRGEHTSGMYAIRPSNSQVFHVYCDVISGSPWT LIQHRIDGSQNFNETWENYKYGFGRLDGEFWLGLEKIYSIVKQSNYVLRIE LEDWKDNKHIEYSFYLGNETNYTLHLVAITGNVPNAIPENKDLVFSTWD HKAKGHFNCPEGYSGGWWWHDECENNLNGKYNKPRASSKPERRRGL SWKSQNGRLYSIKSTKMLIHPTD
<u>40</u>	<u>242-455KQ</u>	IPAECTTIYNRGEHTSGMYAIRPSNSQVFHVYCDVISGSPWT LIQHRIDGSQNFNETWENYKYGFGRLDGEFWLGLEKIYSIVKQSNYVLRIE LEDWKDNKHIEYSFYLGNETNYTLHLVAITGNVPNAIPENKDLVFSTWD HKAKGHFNCPEGYSGGWWWHDECENNLNGKYNKPRASQSPERRRGL SWKSQNGRLYSIKSTKMLIHPTD
<u>41</u>	<u>242-455KS</u>	IPAECTTIYNRGEHTSGMYAIRPSNSQVFHVYCDVISGSPWT LIQHRIDGSQNFNETWENYKYGFGRLDGEFWLGLEKIYSIVKQSNYVLRIE LEDWKDNKHIEYSFYLGNETNYTLHLVAITGNVPNAIPENKDLVFSTWD HKAKGHFNCPEGYSGGWWWHDECENNLNGKYNKPRASSKPERRRGL SWKSQNGRLYSIKSTKMLIHPTD
<u>42</u>	<u>Canine 227KQ</u>	FLHLNETKNVEHNDIPANCTTIYNRGEHTSGIYSIRPSNSQVFHVYCDVKS GSSWTLIQHRIDGSQNFNETWENYRYGFGRLDGEFWLGLEKIYSIVKQSN YILRIELEDWNDNKHIEYFFHLGNHETNYTLHLVEITGNILNALPEHKDLV STWDHKAKGHVNCPESSYGGWWWHNVCGENNLNGKYNKQRAQTKPE RRRGLYWKSQNGRLYSIKSTKMLIHPIIDSESSE
<u>43</u>	<u>Canine 227KS</u>	FLHLNETKNVEHNDIPANCTTIYNRGEHTSGIYSIRPSNSQVFHVYCDVKS GSSWTLIQHRIDGSQNFNETWENYRYGFGRLDGEFWLGLEKIYSIVKQSN YILRIELEDWNDNKHIEYFFHLGNHETNYTLHLVEITGNILNALPEHKDLV STWDHKAKGHVNCPESSYGGWWWHNVCGENNLNGKYNKQRASTKPER RRRGLYWKSQNGRLYSIKSTKMLIHPIIDSESSE
<u>44</u>	<u>Sequência de ácido nucleico 225WT</u>	ACTACTCCCTTTCTTCAGTTGAATGAAATAAGAAATGTAAAACATGATG GCATTCTGCTGAATGTACCACCATTTATAACAGAGGTGAACATACAAG TGGCATGTATGCCATCAGACCCAGCAACTCTCAAGTTTTTCATGTCTAC TGTGATGTTATATCAGGTAGTCCATGGACATTAATCAACATCGAATAG ATGGATCACAAAACCTTCAATGAAACGTGGGAGAACTACAAATATGGTTT TGGGAGGCTTGATGGAGAATTTTGGTTGGGCCTAGAGAAGATATACTC CATAGTGAAGCAATCTAATTATGTTTTACGAATTGAGTTGGAAGACTGG AAAGACAACAAACATTATATTGAATATTCTTTTTACTTGGGAAATCACGA AACCAACTATACGCTACATCTAGTTGCGATTACTGGCAATGTCCCAAT GCAATCCCGGAAAACAAAGATTTGGTGTCTTACTTGGGATCACAAAG CAAAAGGACACTTCAACTGTCCAGAGGGTTATTCAGGAGGCTGGTGGT GGCATGATGAGTGTGGAGAAAACAACTAAATGGTAAATATAACAAAC CAAGAGCAAAATCTAAGCCAGAGAGGAGAAGAGGATTATCTTGGAAAGT CTCAAAATGGAAGGTTATACTCTATAAAATCAACCAAAATGTTGATCCAT CCAACAGATTCAGAAAGCTTTGAA

SEQ ID	Construto	Sequência
<u>45</u>	<u>Sequência de ácido nucleico 225KQ</u>	ACTACTCCCTTTCTTCAGTTGAATGAAATAAGAAATGTAAAACATGATG GCATTCTGCTGAATGTACCACCATTTATAACAGAGGTGAACATACAAG TGGCATGTATGCCATCAGACCCAGCAACTCTCAAGTTTTTCATGTCTAC TGTGATGTTATATCAGGTAGTCCATGGACATTAATTCAACATCGAATAG ATGGATCACAAAACTTCAATGAAACGTGGGAGAACTACAAATATGGTTT TGGGAGGCTTGATGGAGAATTTTGGTTGGGCCTAGAGAAGATATACTC CATAGTGAAGCAATCTAATTATGTTTTACGAATTGAGTTGGAAGACTGG AAAGACAACAAACATTATATTGAATATTCTTTTTACTTGGGAAATCACGA AACCAACTATACGCTACATCTAGTTGCGATTACTGGCAATGTCCCAAT GCAATCCCGGAAAACAAAGATTTGGTGTCTTACTTGGGATCACAAAG CAAAGGACACTTCAACTGTCCAGAGGGTTATTCAGGAGGCTGGTGGT GGCATGATGAGTGTGGAGAAAACAACCTAAATGGTAAATATAACAAC CAAGAGCACAATCTAAGCCAGAGAGGAGAAGAGGATTATCTTGGAAAT CTCAAATGGAAGGTTATACTCTATAAAATCAACCAAATGTTGATCCAT CCAACAGATTCAGAAAGCTTTGAA
<u>46</u>	<u>Sequência de ácido nucleico 225KS</u>	ACTACTCCCTTTCTTCAGTTGAATGAAATAAGAAATGTAAAACATGATG GCATTCTGCTGAATGTACCACCATTTATAACAGAGGTGAACATACAAG TGGCATGTATGCCATCAGACCCAGCAACTCTCAAGTTTTTCATGTCTAC TGTGATGTTATATCAGGTAGTCCATGGACATTAATTCAACATCGAATAG ATGGATCACAAAACTTCAATGAAACGTGGGAGAACTACAAATATGGTTT TGGGAGGCTTGATGGAGAATTTTGGTTGGGCCTAGAGAAGATATACTC CATAGTGAAGCAATCTAATTATGTTTTACGAATTGAGTTGGAAGACTGG AAAGACAACAAACATTATATTGAATATTCTTTTTACTTGGGAAATCACGA AACCAACTATACGCTACATCTAGTTGCGATTACTGGCAATGTCCCAAT GCAATCCCGGAAAACAAAGATTTGGTGTCTTACTTGGGATCACAAAG CAAAGGACACTTCAACTGTCCAGAGGGTTATTCAGGAGGCTGGTGGT GGCATGATGAGTGTGGAGAAAACAACCTAAATGGTAAATATAACAAC CAAGAGCAAGCTCTAAGCCAGAGAGGAGAAGAGGATTATCTTGGAAAT CTCAAATGGAAGGTTATACTCTATAAAATCAACCAAATGTTGATCCAT CCAACAGATTCAGAAAGCTTTGAA
<u>47</u>	<u>Sequência de ácido nucleico 226KQ</u>	ACTCCCTTTCTTCAGTTGAATGAAATAAGAAATGTAAAACATGATGGCA TTCTGCTGAATGTACCACCATTTATAACAGAGGTGAACATACAAGTGG CATGTATGCCATCAGACCCAGCAACTCTCAAGTTTTTCATGTCTACTGT GATGTTATATCAGGTAGTCCATGGACATTAATTCAACATCGAATAGATG GATCACAAAACTTCAATGAAACGTGGGAGAACTACAAATATGGTTTTGG GAGGCTTGATGGAGAATTTTGGTTGGGCCTAGAGAAGATATACTCCAT AGTGAAGCAATCTAATTATGTTTTACGAATTGAGTTGGAAGACTGGAAA GACAACAAACATTATATTGAATATTCTTTTTACTTGGGAAATCACGAAAC CAACTATACGCTACATCTAGTTGCGATTACTGGCAATGTCCCAATGCA ATCCCGGAAAACAAAGATTTGGTGTCTTACTTGGGATCACAAAGCAA AAGGACACTTCAACTGTCCAGAGGGTTATTCAGGAGGCTGGTGGTGG CATGATGAGTGTGGAGAAAACAACCTAAATGGTAAATATAACAACCAA GAGCACAATCTAAGCCAGAGAGGAGAAGAGGATTATCTTGGAAAGTCTC AAAATGGAAGGTTATACTCTATAAAATCAACCAAATGTTGATCCATCC AACAGATTCAGAAAGCTTTGAA
<u>48</u>	<u>Sequência de ácido nucleico 226KS</u>	ACTCCCTTTCTTCAGTTGAATGAAATAAGAAATGTAAAACATGATGGCA TTCTGCTGAATGTACCACCATTTATAACAGAGGTGAACATACAAGTGG CATGTATGCCATCAGACCCAGCAACTCTCAAGTTTTTCATGTCTACTGT GATGTTATATCAGGTAGTCCATGGACATTAATTCAACATCGAATAGATG GATCACAAAACTTCAATGAAACGTGGGAGAACTACAAATATGGTTTTGG GAGGCTTGATGGAGAATTTTGGTTGGGCCTAGAGAAGATATACTCCAT AGTGAAGCAATCTAATTATGTTTTACGAATTGAGTTGGAAGACTGGAAA GACAACAAACATTATATTGAATATTCTTTTTACTTGGGAAATCACGAAAC CAACTATACGCTACATCTAGTTGCGATTACTGGCAATGTCCCAATGCA ATCCCGGAAAACAAAGATTTGGTGTCTTACTTGGGATCACAAAGCAA AAGGACACTTCAACTGTCCAGAGGGTTATTCAGGAGGCTGGTGGTGG CATGATGAGTGTGGAGAAAACAACCTAAATGGTAAATATAACAACCAA GAGCAAGCTCTAAGCCAGAGAGGAGAAGAGGATTATCTTGGAAAGTCTC AAAATGGAAGGTTATACTCTATAAAATCAACCAAATGTTGATCCATCC AACAGATTCAGAAAGCTTTGAA

SEQ ID	Construto	Sequência
<u>49</u>	<u>Sequência de ácido nucleico 228KQ</u>	TTTCTTCAGTTGAATGAAATAAGAAATGTAAAACATGATGGCATTCTGCTGAATGTACCACCATTATAACAGAGGTGAACATACAAGTGGCATGTATGCCATCAGACCCAGCAACTCTCAAGTTTTTCATGTCTACTGTGATGTTATATCAGGTAGTCCATGGACATTAATTCAACATCGAATAGATGGATCACAAAACCTTCAATGAAACGTGGGAGAAGTACAAATATGGTTTTGGGAGGC TTGATGGAGAATTTTGGTTGGCCCTAGAGAAGATATACTCCATAGTGAA GCAATCTAATTATGTTTTACGAATTGAGTTGGAAGACTGGAAAGACAAC AAACATTATATTGAATATTCTTTTTACTTTGGGAAATCACGAAACCAACTA TACGCTACATCTAGTTGCGATTACTGGCAATGTCCCAATGCAATCCC GGAAAACAAAGATTTGGTGTCTTACTTTGGGATCACAAAGCAAAGGA CACTTCAACTGTCCAGAGGGTTATTCAGGAGGCTGGTGGTGCCATGAT GAGTGTGGAGAAAACAACCTAAATGGTAAATATAACAAACCAAGAGCA CAATCTAAGCCAGAGAGGAGAAGAGGATTATCTTGAAGTCTCAAAAT GGAAGGTTATACTCTATAAAATCAACCAAAATGTTGATCCATCCAACAG ATTCAGAAAAGCTTTGAA
<u>50</u>	<u>Sequência de ácido nucleico 228KS</u>	TTTCTTCAGTTGAATGAAATAAGAAATGTAAAACATGATGGCATTCTGCTGAATGTACCACCATTATAACAGAGGTGAACATACAAGTGGCATGTATGCCATCAGACCCAGCAACTCTCAAGTTTTTCATGTCTACTGTGATGTTATATCAGGTAGTCCATGGACATTAATTCAACATCGAATAGATGGATCACAAAACCTTCAATGAAACGTGGGAGAAGTACAAATATGGTTTTGGGAGGC TTGATGGAGAATTTTGGTTGGCCCTAGAGAAGATATACTCCATAGTGAAAGTGAAGCAATCTAATTATG GCAATCTAATTATGTTTTACGAATTGAGTTGGAAGACTGGAAAGACAAC AAACATTATATTGAATATTCTTTTTACTTTGGGAAATCACGAAACCAACTA TACGCTACATCTAGTTGCGATTACTGGCAATGTCCCAATGCAATCCC GGAAAACAAAGATTTGGTGTCTTACTTTGGGATCACAAAGCAAAGGA CACTTCAACTGTCCAGAGGGTTATTCAGGAGGCTGGTGGTGCCATGAT GAGTGTGGAGAAAACAACCTAAATGGTAAATATAACAAACCAAGAGCA AGCTCTAAGCCAGAGAGGAGAAGAGGATTATCTTGAAGTCTCAAAAT GGAAGGTTATACTCTATAAAATCAACCAAAATGTTGATCCATCCAACAG ATTCAGAAAAGCTTTGAA
<u>51</u>	<u>Sequência de ácido nucleico 233KQ</u>	GAAATAAGAAATGTAAAACATGATGGCATTCTGCTGAATGTACCACCA TTTATAACAGAGGTGAACATACAAGTGGCATGTATGCCATCAGACCCA GCAACTCTCAAGTTTTTCATGTCTACTGTGATGTTATATCAGGTAGTCC ATGGACATTAATTCAACATCGAATAGATGGATCACAAAACCTTCAATGAA ACGTGGGAGAAGTACAAATATGGTTTTGGGAGGCTTGATGGAGAATTT TGGTTGGCCCTAGAGAAGATATACTCCATAGTGAAAGCAATCTAATTATG TTTTACGAATTGAGTTGGAAGACTGGAAAGACAACAAACATTATATTGA ATATTCTTTTTACTTTGGGAAATCACGAAACCAACTATACGCTACATCTAG TTGCGATTACTGGCAATGTCCCAATGCAATCCCGAAAACAAAGATTT GGTGTCTTACTTTGGGATCACAAAGCAAAGGACACTTCAACTGTCCA GAGGGTTATTCAGGAGGCTGGTGGTGGCATGATGAGTGTGGAGAAAA CAACCTAAATGGTAAATATAACAAACCAAGAGCACAATCTAAGCCAGAG AGGAGAAGAGGATTATCTTGAAGTCTCAAAATGGAAGGTTATACTCTA TAAATCAACCAAAATGTTGATCCATCCAACAGATTCAGAAAAGCTTTGA A
<u>52</u>	<u>Sequência de ácido nucleico 233KS</u>	GAAATAAGAAATGTAAAACATGATGGCATTCTGCTGAATGTACCACCA TTTATAACAGAGGTGAACATACAAGTGGCATGTATGCCATCAGACCCA GCAACTCTCAAGTTTTTCATGTCTACTGTGATGTTATATCAGGTAGTCC ATGGACATTAATTCAACATCGAATAGATGGATCACAAAACCTTCAATGAA ACGTGGGAGAAGTACAAATATGGTTTTGGGAGGCTTGATGGAGAATTT TGGTTGGCCCTAGAGAAGATATACTCCATAGTGAAAGCAATCTAATTATG TTTTACGAATTGAGTTGGAAGACTGGAAAGACAACAAACATTATATTGA ATATTCTTTTTACTTTGGGAAATCACGAAACCAACTATACGCTACATCTAG TTGCGATTACTGGCAATGTCCCAATGCAATCCCGAAAACAAAGATTT GGTGTCTTACTTTGGGATCACAAAGCAAAGGACACTTCAACTGTCCA GAGGGTTATTCAGGAGGCTGGTGGTGGCATGATGAGTGTGGAGAAAA CAACCTAAATGGTAAATATAACAAACCAAGAGCAAGTCTAAGCCAGA GAGGAGAAGAGGATTATCTTGAAGTCTCAAAATGGAAGGTTATACTCT TATAAAATCAACCAAAATGTTGATCCATCCAACAGATTCAGAAAAGCTTT GAA

SEQ ID	Construto	Sequência
53	<u>Sequência de ácido nucleico 241KQ</u>	GGCATTCTGCTGAATGTACCACCATTTATAACAGAGGTGAACATACAA GTGGCATGTATGCCATCAGACCCAGCAACTCTCAAGTTTTTCATGTCTA CTGTGATGTTATATCAGGTAGTCCATGGACATTAATTCAACATCGAATA GATGGATCACAAAACCTCAATGAAACGTGGGAGAACTACAAATATGGTT TTGGGAGGCTTGATGGAGAATTTTGGTTGGGCCTAGAGAAGATATACT CCATAGTGAAGCAATCTAATTATGTTTTACGAATTGAGTTGGAAGACTG GAAAGACAACAAACATTATATTGAATATTCTTTTTACTTGGGAAATCAG AAACCAACTATACGCTACATCTAGTTGCGATTACTGGCAATGTCCCCAA TGCAATCCCGGAAAACAAGATTTGGTGTCTACTTGGGATCACAAA GCAAAAGGACACTTCAACTGTCCAGAGGGTTATTAGGAGGCTGGTGG TGGCATGATGAGTGTGGAGAAAACAACCTAAATGGTAAATATAACAAAC CAAGAGCACAATCTAAGCCAGAGAGGAGAAGAGGATTATCTTGGAAAGT CTCAAAATGGAAGTTATACTCTATAAAAATCAACAAAATGTTGATCCAT CCAACAGATTCAGAAAAGCTTTGAA
54	<u>Sequência de ácido nucleico 241KS</u>	GGCATTCTGCTGAATGTACCACCATTTATAACAGAGGTGAACATACAA GTGGCATGTATGCCATCAGACCCAGCAACTCTCAAGTTTTTCATGTCT ACTGTGATGTTATATCAGGTAGTCCATGGACATTAATTCAACATCGAA TAGATGGATCACAAAACCTCAATGAAACGTGGGAGAACTACAAATATG GTTTTGGGAGGCTTGATGGAGAATTTTGGTTGGGCCTAGAGAAGATA TACTCCATAGTGAAGCAATCTAATTATGTTTTACGAATTGAGTTGGAA GACTGGAAGACAACAAACATTATATTGAATATTCTTTTTACTTGGG AAATCACGAAACCAACTATACGCTACATCTAGTTGCGATTACTGGCA ATGTCCCAATGCAATCCCGGAAAACAAGATTTGGTGTCTACTT GGGATCACAAAGCAAAGGACACTTCAACTGTCCAGAGGGTTATTCA GGAGGCTGGTGGTGGCATGATGAGTGTGGAGAAAACAACCTAAAT GGTAAATATAACAAACCAAGAGCAAGCTCTAAGCCAGAGAGGAGAA GAGGATTATCTTGGAAAGTCTCAAAATGGAAGTTATACTCTATAAAA TCAACAAAATGTTGATCCATCCAACAGATTCAGAAAAGCTTTGAA
55	<u>Sequência de ácido nucleico 242KQ</u>	ATTCCTGCTGAATGTACCACCATTTATAACAGAGGTGAACATACAAG TGGCATGTATGCCATCAGACCCAGCAACTCTCAAGTTTTTCATGTCT ACTGTGATGTTATATCAGGTAGTCCATGGACATTAATTCAACATCGAA TAGATGGATCACAAAACCTCAATGAAACGTGGGAGAACTACAAATAT GGTTTTGGGAGGCTTGATGGAGAATTTTGGTTGGGCCTAGAGAAGA TATACTCCATAGTGAAGCAATCTAATTATGTTTTACGAATTGAGTTGG AAGACTGGAAGACAACAAACATTATATTGAATATTCTTTTTACTTGG GAAATCACGAAACCAACTATACGCTACATCTAGTTGCGATTACTGGC AATGTCCCAATGCAATCCCGGAAAACAAGATTTGGTGTCTACT TTGGGATCACAAAGCAAAGGACACTTCAACTGTCCAGAGGGTTA TTCAGGAGGCTGGTGGTGGCATGATGAGTGTGGAGAAAACAACCT AAATGGTAAATATAACAAACCAAGAGCACAATCTAAGCCAGAGAGGA GAAGAGGATTATCTTGGAAAGTCTCAAAATGGAAGTTATACTCTATA AAATCAACAAAATGTTGATCCATCCAACAGATTCAGAAAAGCTTTGAA
56	<u>Sequência de ácido nucleico 242KS</u>	ATTCCTGCTGAATGTACCACCATTTATAACAGAGGTGAACATACAAG GGCATGTATGCCATCAGACCCAGCAACTCTCAAGTTTTTCATGTCTAC TGTGATGTTATATCAGGTAGTCCATGGACATTAATTCAACATCGAATA GATGGATCACAAAACCTCAATGAAACGTGGGAGAACTACAAATATGG TTTTGGGAGGCTTGATGGAGAATTTTGGTTGGGCCTAGAGAAGATA TACTCCATAGTGAAGCAATCTAATTATGTTTTACGAATTGAGTTGGAA GACTGGAAGACAACAAACATTATATTGAATATTCTTTTTACTTGGGA AATCACGAAACCAACTATACGCTACATCTAGTTGCGATTACTGGCAA TGTCCCAATGCAATCCCGGAAAACAAGATTTGGTGTCTACTT GGGATCACAAAGCAAAGGACACTTCAACTGTCCAGAGGGTTATTCA GGAGGCTGGTGGTGGCATGATGAGTGTGGAGAAAACAACCTAAAT GGTAAATATAACAAACCAAGAGCAAGCTCTAAGCCAGAGAGGAGAA GAGGATTATCTTGGAAAGTCTCAAAATGGAAGTTATACTCTATAAAA TCAACAAAATGTTGATCCATCCAACAGATTCAGAAAAGCTTTGAA

SEQ ID	Construto	Sequência
<u>57</u>	<u>Sequência de ácido nucleico c227KQ</u>	TTTTTGCATCTCAACGAAACGAAGAATGTCGAACACAACGACATT CCGGCAAATTGCACAACACTATCTACAATAGAGGGCGAACATACGTCCGGT ATCTACTCCATTAGACCTTCAAACAGCCAGGTATTCAATGTGTACTGCG ATGTAAAGTCAGGATCGTCATGGACACTGATCCAGCATAGGATCGACG GGTCCCAGAACTTCAACGAGACATGGGAGAACTACCGCTATGGATTTG GAAGGCTGGATGGGAGTTCTGGTTGGGACTTGAGAAAACTACAGCA TTGTGAAGCAGTGAACACTACATTCTCCGGATTGAACGGAGGACTGGA ATGACAACAAAACACTACATCGAGTATTTCTTTCATCTCGGCAACCATGA AACGAATTACACCTTGCACCTTGTGGAAATCACGGGCAACATTTTGAAC GCGCTGCCAGAACACAAAGACCTGGTGTTCGACATGGGATCACAAA GCAAAGGGGCACGTGAACTGTCCCGAATCATATAGCGGGGGATGGTG GTGGCACAATGTCTGTGGTGAGAACAATCTCAACGGGAAATACAATA GCAGCGAGCTCAGACGAAACCCGAGCGGCGGAGAGGTCTGTATTGGA AGTCGCAGAATGGACGCCTGTATTTCGATCAAATCGACGAAAATGCTCA TCCACCCCATCGACTCCGAATCGTCGGAG
<u>58</u>	<u>207Kdel</u>	IQEPTEISLSSKPRAPRTTPFLQLNEIRNVKHDGIPAECTTIYNRGEHTSGM YAIRPSNSQVFHVYCDVISGSPWTLIQHRIDGSQNFNETWENYKYGFGRD DGEFWLGLEKIYSIVKQSNYVLRIELEDWKNKHIEYSFYLGHNHETNYTL HLVAITGNVPAIPENKDLVFSTWDHKAKGHFNCPGEGYSGGWWWHDEC GENNLNGKYNKPRASKPERRRGLSWKSQNGRLYSIKSTKMLIHPTDSESE E
<u>59</u>	<u>225Kdel</u>	TTPFLQLNEIRNVKHDGIPAECTTIYNRGEHTSGMYAIRPSNSQVFHVYCD VISGSPWTLIQHRIDGSQNFNETWENYKYGFGRDGEFWLGLEKIYSIVKQ SNYVLRIELEDWKNKHIEYSFYLGHNHETNYTLHLVAITGNVPAIPENKDL LVFSTWDHKAKGHFNCPGEGYSGGWWWHDECENNLNGKYNKPRASKP ERRRGLSWKSQNGRLYSIKSTKMLIHPTDSESE
<u>60</u>	<u>226Kdel</u>	TPFLQLNEIRNVKHDGIPAECTTIYNRGEHTSGMYAIRPSNSQVFHVYCDVI SGSPWTLIQHRIDGSQNFNETWENYKYGFGRDGEFWLGLEKIYSIVKQS NYVLRIELEDWKNKHIEYSFYLGHNHETNYTLHLVAITGNVPAIPENKDL VFSTWDHKAKGHFNCPGEGYSGGWWWHDECENNLNGKYNKPRASKPE RRRGLSWKSQNGRLYSIKSTKMLIHPTDSESE
<u>61</u>	<u>228Kdel</u>	FLQLNEIRNVKHDGIPAECTTIYNRGEHTSGMYAIRPSNSQVFHVYCDVIS GSPWTLIQHRIDGSQNFNETWENYKYGFGRDGEFWLGLEKIYSIVKQSN YVLRIELEDWKNKHIEYSFYLGHNHETNYTLHLVAITGNVPAIPENKDLV FSTWDHKAKGHFNCPGEGYSGGWWWHDECENNLNGKYNKPRASKPER RRGLSWKSQNGRLYSIKSTKMLIHPTDSESE
<u>62</u>	<u>233Kdel</u>	EIRNVKHDGIPAECTTIYNRGEHTSGMYAIRPSNSQVFHVYCDVISGSPWT LIQHRIDGSQNFNETWENYKYGFGRDGEFWLGLEKIYSIVKQSNYVLRIE LEDWKNKHIEYSFYLGHNHETNYTLHLVAITGNVPAIPENKDLVFSTWD HKAKGHFNCPGEGYSGGWWWHDECENNLNGKYNKPRASKPERRRGLS WKSQNGRLYSIKSTKMLIHPTDSESE
<u>63</u>	<u>241Kdel</u>	GIPAECTTIYNRGEHTSGMYAIRPSNSQVFHVYCDVISGSPWTLIQHRIDG SQNFNETWENYKYGFGRDGEFWLGLEKIYSIVKQSNYVLRIELEDWKN KHIEYSFYLGHNHETNYTLHLVAITGNVPAIPENKDLVFSTWDHKAKGH FNCPGEGYSGGWWWHDECENNLNGKYNKPRASKPERRRGLSWKSQNG RLYSIKSTKMLIHPTDSESE
<u>64</u>	<u>242Kdel</u>	IPAECTTIYNRGEHTSGMYAIRPSNSQVFHVYCDVISGSPWTLIQHRIDGS QNFNETWENYKYGFGRDGEFWLGLEKIYSIVKQSNYVLRIELEDWKNK HYIEYSFYLGHNHETNYTLHLVAITGNVPAIPENKDLVFSTWDHKAKGHFN CPGEGYSGGWWWHDECENNLNGKYNKPRASKPERRRGLSWKSQNGR LYSIKSTKMLIHPTDSESE
<u>65</u>	<u>225-455Kdel</u>	TTPFLQLNEIRNVKHDGIPAECTTIYNRGEHTSGMYAIRPSNSQVFHVYCD VISGSPWTLIQHRIDGSQNFNETWENYKYGFGRDGEFWLGLEKIYSIVKQ SNYVLRIELEDWKNKHIEYSFYLGHNHETNYTLHLVAITGNVPAIPENKDL LVFSTWDHKAKGHFNCPGEGYSGGWWWHDECENNLNGKYNKPRASKP ERRRGLSWKSQNGRLYSIKSTKMLIHPTD
<u>66</u>	<u>226-455Kdel</u>	TPFLQLNEIRNVKHDGIPAECTTIYNRGEHTSGMYAIRPSNSQVFHVYCDVI SGSPWTLIQHRIDGSQNFNETWENYKYGFGRDGEFWLGLEKIYSIVKQS NYVLRIELEDWKNKHIEYSFYLGHNHETNYTLHLVAITGNVPAIPENKDL VFSTWDHKAKGHFNCPGEGYSGGWWWHDECENNLNGKYNKPRASKPE RRRGLSWKSQNGRLYSIKSTKMLIHPTD

SEQ ID	Construto	Sequência
<u>67</u>	<u>228-455Kdel</u>	FLQLNEIRNVKHDGIPAECTTIYNRGEHTSGMYAIRPSNSQVFHVYCDVIS GSPWTLIQHRIDGSQNFNETWENYKYGFGRLDGEFWLGLEKIYSIVKQSN YVLRIELEDWKDNKHIEYSFYLGNETNYTLHLVAITGNVPNAIPENKDLV FSTWDHKAKGHFNCPGEGYSGGWWWHDECENNLNGKYNKPRASKPER RRGLSWKSQNGRLYSIKSTKMLIHPTD
<u>68</u>	<u>233-455Kdel</u>	EIRNVKHDGIPAECTTIYNRGEHTSGMYAIRPSNSQVFHVYCDVISGSPWT LIQHRIDGSQNFNETWENYKYGFGRLDGEFWLGLEKIYSIVKQSNYVLRIE LEDWKDNKHIEYSFYLGNETNYTLHLVAITGNVPNAIPENKDLVSTWD HKAKGHFNCPGEGYSGGWWWHDECENNLNGKYNKPRASKPERRRGLS WKSQNGRLYSIKSTKMLIHPTD
<u>69</u>	<u>241-455Kdel</u>	GIPAECTTIYNRGEHTSGMYAIRPSNSQVFHVYCDVISGSPWTLIQHRIDG SQNFNETWENYKYGFGRLDGEFWLGLEKIYSIVKQSNYVLRIELEDWKDN KHIEYSFYLGNETNYTLHLVAITGNVPNAIPENKDLVSTWDHKAKGHF NCPGEGYSGGWWWHDECENNLNGKYNKPRASKPERRRGLSWKSQNG RLYSIKSTKMLIHPTD
<u>70</u>	<u>242-455Kdel</u>	IPAECTTIYNRGEHTSGMYAIRPSNSQVFHVYCDVISGSPWTLIQHRIDGS QNFNETWENYKYGFGRLDGEFWLGLEKIYSIVKQSNYVLRIELEDWKDNK HYIEYSFYLGNETNYTLHLVAITGNVPNAIPENKDLVSTWDHKAKGHFN CPGEGYSGGWWWHDECENNLNGKYNKPRASKPERRRGLSWKSQNGR LYSIKSTKMLIHPTD
<u>71</u>	hANGPTL1 1-491	MKTFTWTLGVLFFLLVDTGHCRRGGQFKIKKINQRRYPRATDGGKEEAKKCA YTFLVPEQRITGPICVNTKQDASTIKDMITRMDLENLKDVL SRQKREIDVL QLVVDVDGNIVNEVKLLRKESRNMNSRVTQLYMQLLHEIRKRDNSLELSQ LENKILNVTTEMLKMATRYRELEVKYASLTDLVNNQSVMITLLEEQLRIFS RQDTHVSPPLVQVVPQHIPSQQTTPGLLGGNEIQRDPGYPRDLMPPPD LATSPKSPFKIPPVTFINEGPFKDCQQAKEAGHSVSGIYMIKPENSNGPM QLWCENSLDPGGWTVIQKRTDGSVNFNRWENYKKGFGNIDGEYWLGL ENIYMLSNQDNYKLLIELEDWSDKKVYAEYSSFRLEPESEFYRLRLGTYYQG NAGDSMMWHNGKQFTTLDRDKDMYAGNCAHFHKGWWYNACAHSNL NGVWYRGGHYRSKHQDGIFWAEYRGGSYSLRAVQMMIKPID
<u>72</u>	CT hANGPTL1 271-491	FINEGPFKDCQQAKEAGHSVSGIYMIKPENSNGPMQLWCENSLDPGGWT VIQKRTDGSVNFNRWENYKKGFGNIDGEYWLGLENIYMLSNQDNYKLLI ELEDWSDKKVYAEYSSFRLEPESEFYRLRLGTYYQGNAGDSMMWHNGKQ FTTLDRDKDMYAGNCAHFHKGWWYNACAHSNLNGVWYRGGHYRSKH QDGIFWAEYRGGSYSLRAVQMMIKPID
<u>73</u>	hANGPTL4 1-406	MSGAPTAGAALMLCAATAVLLSAQGGPVQSKSPRFASWDEMNVLAHGLL QLGQGLREHAERTRSLSALERLSACGSACQGTEGSTDLPLAPESRVD PEVLHSLQTQLKAQNSRIQQLFHKVAQQQRHLEKQHLRIQHLQSQFGLLD HKHLDHEVAKPARRKRLPEMAQPVDPAHNVSRHLRPRDCQELFQVGER QSGLFQIQPQGSPPFLVNCKMTSDGGWTVIQRRHDGSVDFNRPWEAYKA GFGDPHGEFWLGLEKVHSITGDRNSRLAVQLRDWDGNAELLQFSVHLGG EDTAYSLQLTAPVAGQLGATTVPPSGLSVPFSTWDQDHLRRDKNCAKS LSGGWWFGTCSHSNLNGQYFRSIPQQRQKLKKGIFWKTWRGRYYPLQA TTMLIQPMAAEAAS
<u>74</u>	CT hANGPTL4 179-406	SRLHRLPRDCQELFQVGERQSGLFQIQPQGSPPFLVNCKMTSDGGWTVI QRRHDGSVDFNRPWEAYKAGFGDPHGEFWLGLEKVHSITGDRNSRLAV QLRDWDGNAELLQFSVHLGGEDTAYSLQLTAPVAGQLGATTVPPSGLSV PFSTWDQDHLRRDKNCAKSLSGGWWFGTCSHSNLNGQYFRSIPQQRQ KLKKGIFWKTWRGRYYPLQATTMLIQPMAAEAAS

REIVINDICAÇÕES

1. Polipeptídeo isolado, caracterizado pelo fato de que compreende SEQ ID NO: 28.

2. Composição farmacêutica, caracterizada pelo fato de que compreende o polipeptídeo, como definido na reivindicação 1.

3. Composição farmacêutica, de acordo com a reivindicação 2, caracterizada pelo fato de que compreende ainda um tampão.

4. Composição farmacêutica, de acordo com a reivindicação 2, caracterizada pelo fato de que compreende ainda sacarose.

5. Composição farmacêutica, de acordo com a reivindicação 2, caracterizada pelo fato de que compreende sacarose e um tampão.

6. Polipeptídeo isolado, caracterizado pelo fato de que consiste na SEQ ID NO:28.

7. Composição farmacêutica, caracterizada pelo fato de que compreende o polipeptídeo isolado, como definido na reivindicação 6.

8. Composição farmacêutica, de acordo com a reivindicação 7, caracterizada pelo fato de que compreende ainda um tampão.

9. Composição farmacêutica, de acordo com a reivindicação 7, caracterizada pelo fato de que compreende ainda sacarose.

10. Composição farmacêutica, de acordo com a reivindicação 7, caracterizada pelo fato de que compreende sacarose e um tampão.

FIG. 1

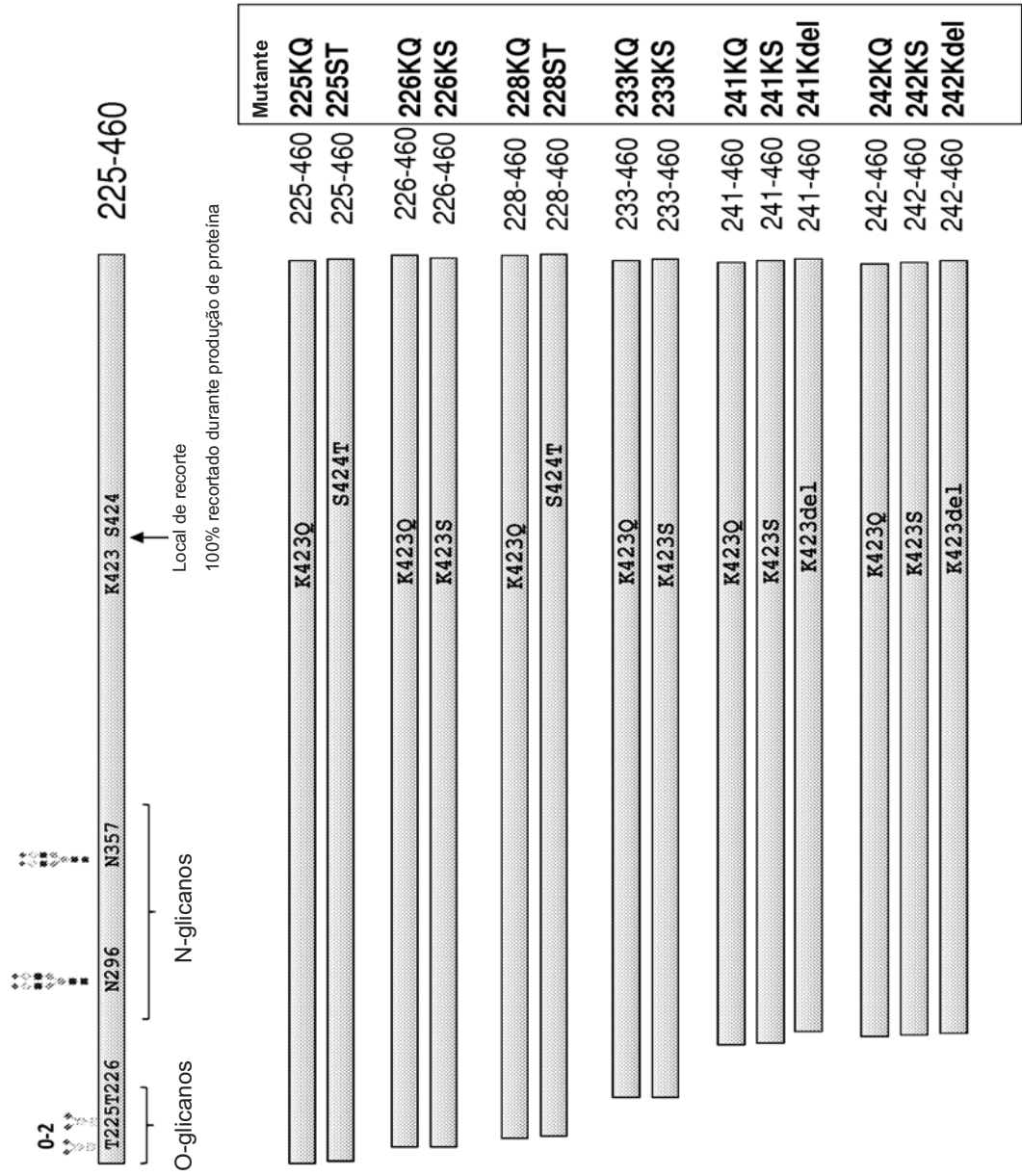
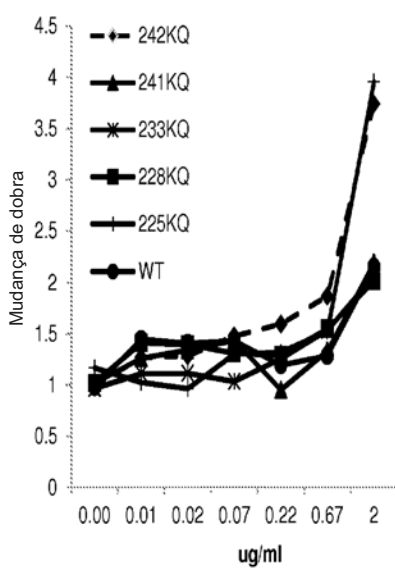
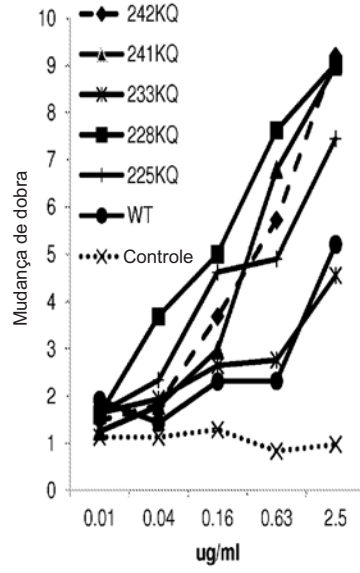


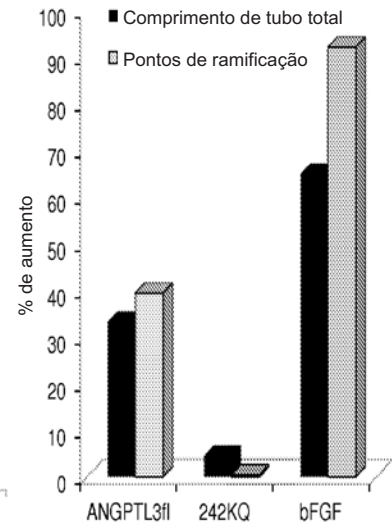
FIG. 2



2A



2B



2C

FIG. 3

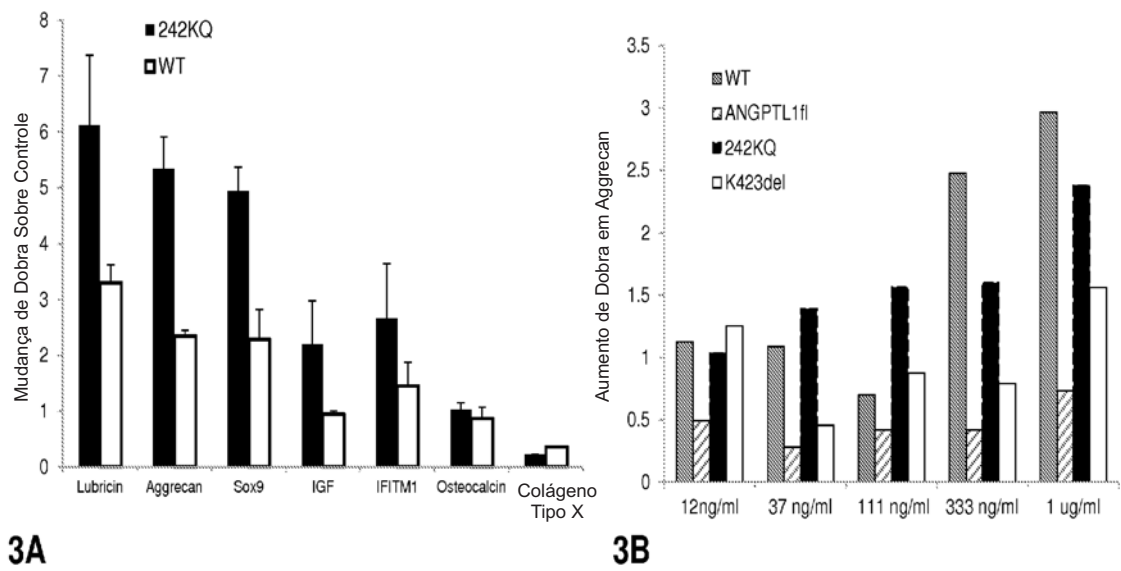


FIG. 4

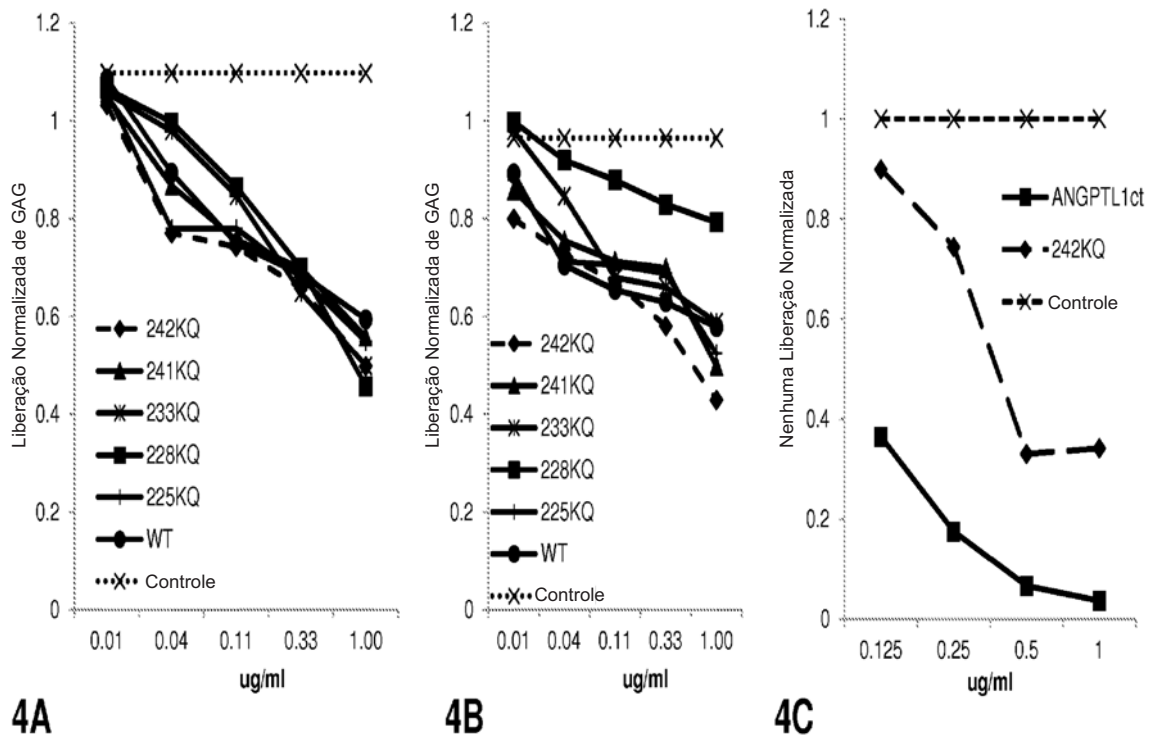
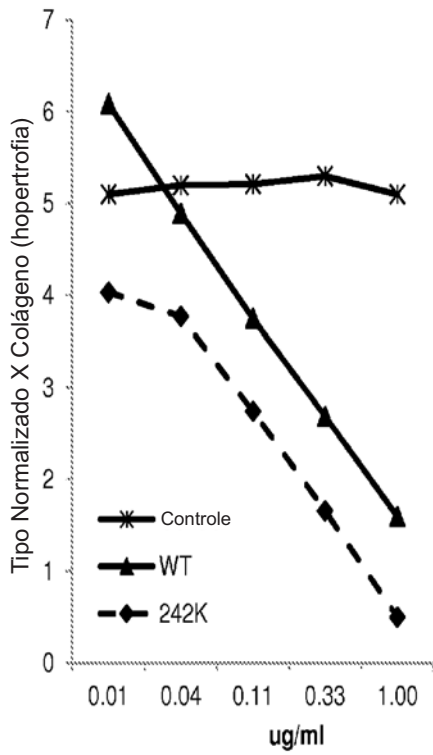
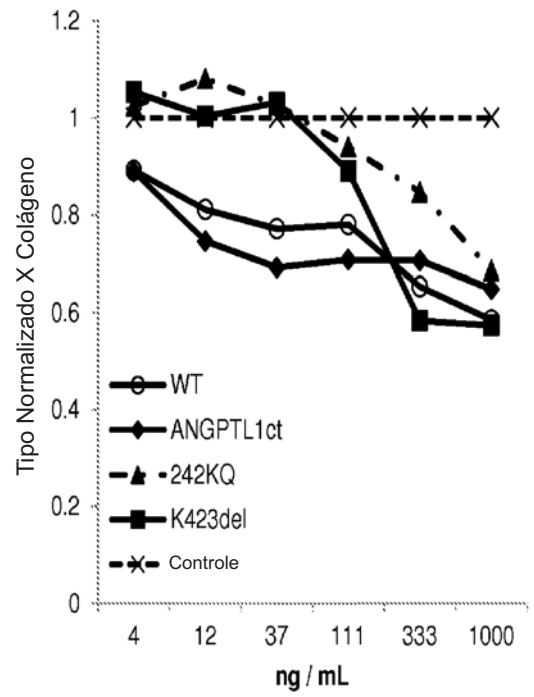


FIG. 5

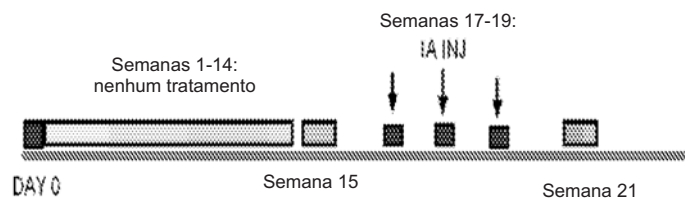


5A

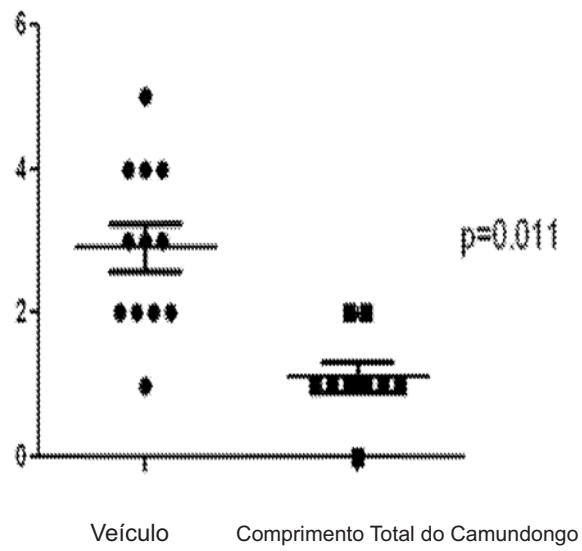


5B

FIG. 6



6A



6B

FIG. 7

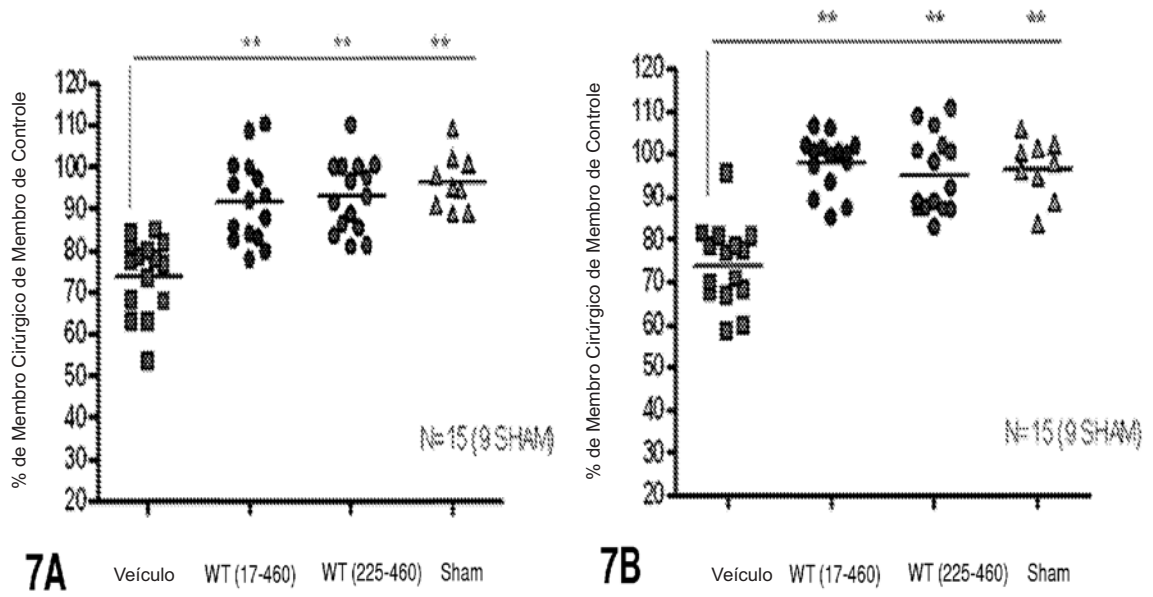


FIG. 8

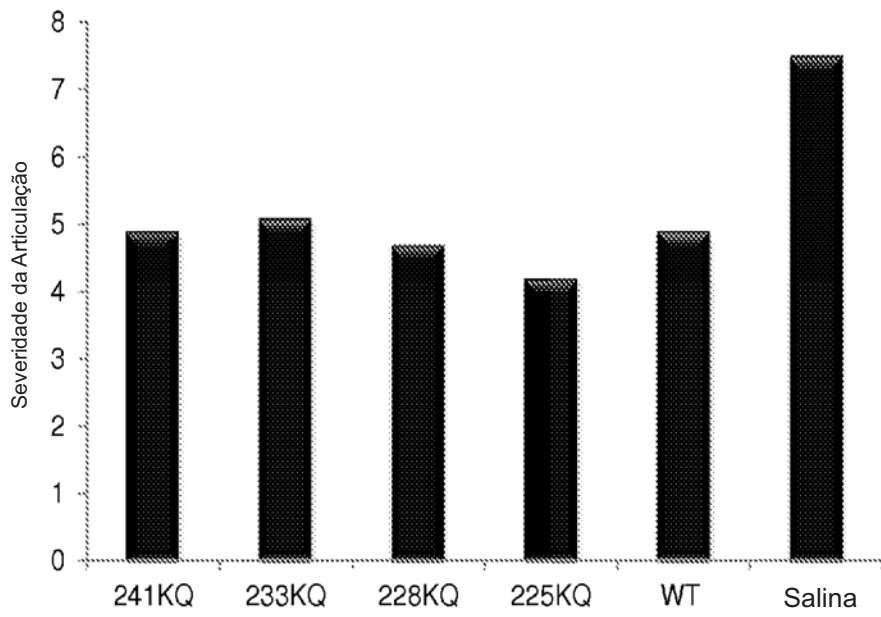


FIG. 9

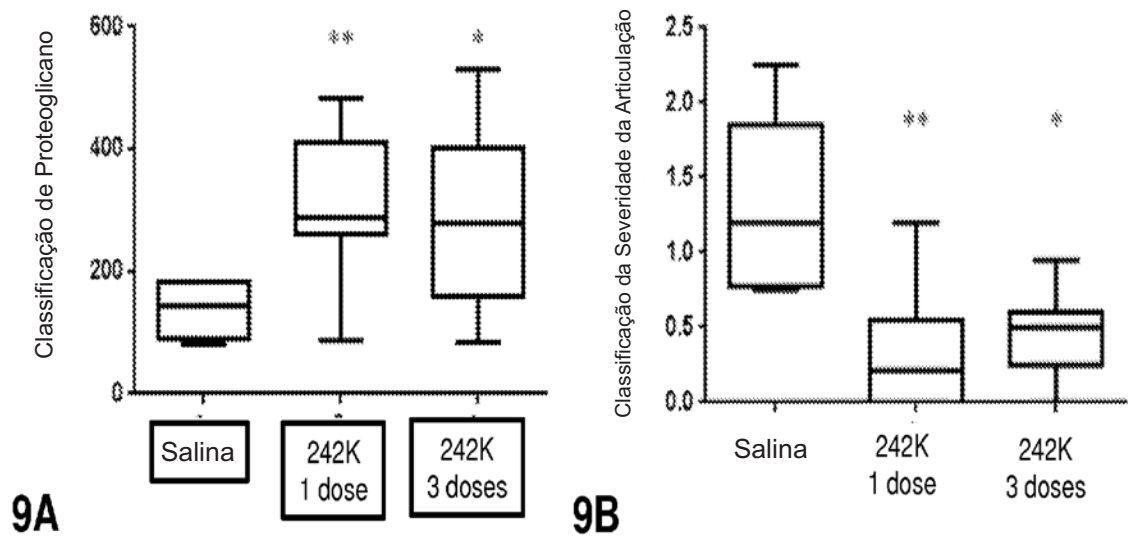


FIG. 10

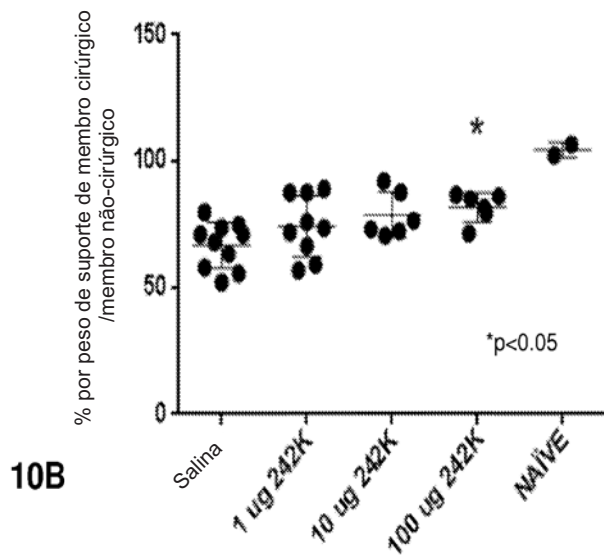
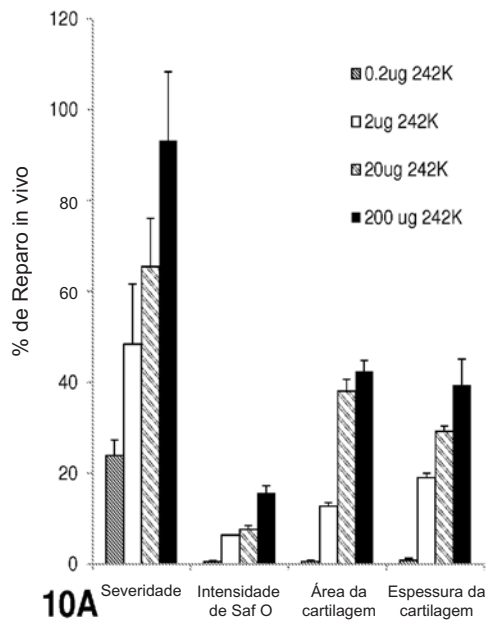


FIG. 11

