



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

(21) PI 0719597-4 A2



(22) Data de Depósito: 21/11/2007
(43) Data da Publicação: 17/12/2013
(RPI 2241)

(51) Int.Cl.:
C07K 14/47
C12N 15/10
C40B 40/02
C12N 9/12
C07K 14/78

(54) Título: PRODUTOS TERAPÊUTICOS
OBJETIVADOS BASEADOS EM PROTEÍNAS
MANIPULADAS PARA RECEPTORES DE QUINASES
DE TIROSINA, INCLUINDO IGF-IR

(57) Resumo:

(30) Prioridade Unionista: 22/11/2006 US 60/860,605,
09/01/2007 US 60/879,666, 09/01/2007 US 60/879,666, 22/11/2006
US 60/860,605

(73) Titular(es): Adnexus, a Bristol-Myers Squibb R&D Company

(72) Inventor(es): David Fabrizio, John Mendlein, Martin C.
Wright, Patrick Gage, Ray Camphausen

(74) Procurador(es): DANNEMANN, SIEMSEN,
BIGLER & IPANEMA MOREIRA

(86) Pedido Internacional: PCT US2007024316 de
21/11/2007

(87) Publicação Internacional: WO 2008/066752de
05/06/2008

Relatório Descritivo da Patente de Invenção para **"PRODUTOS TERAPÊUTICOS OBJETIVADOS BASEADOS EM PROTEÍNAS MANIPULADAS PARA RECEPTORES DE QUINASES DE TIROSINA, INCLUINDO IGF-IR".**

5 PEDIDOS RELACIONADOS

O presente pedido de patente reivindica o benefício dos Pedidos de Patente Provisórios U.S. Nos. 60/860.605, depositado em 22 de Novembro de 2006 e 60/879.666, depositado em 9 de Janeiro de 2007, pedidos os quais são aqui incorporados por referência em sua totalidade.

10 CAMPO DA INVENÇÃO

A presente invenção refere-se à proteínas inovativas que se ligam ao receptor de fator-I de crescimento similar à insulina (IGF-IR), bem como outras proteínas importantes. A invenção também refere-se à proteínas inovativas em preparados farmacêuticos e derivados de tais proteínas e aos usos dos mesmos em aplicações diagnósticas, de pesquisa e terapêuticas. A invenção ainda se refere à células compreendendo tais proteínas, polinucleotídeos que codificam tais proteínas ou fragmentos dos mesmos e vetores compreendendo os polinucleotídeos que codificam as proteínas inovativas.

20 INTRODUÇÃO

O receptor de fator-I de crescimento similar à insulina (IGF-IR) é uma proteína heterotetramérica transmembrana a qual tem duas cadeias alfa extracelulares e duas cadeias beta abrangendo a membrana em uma configuração beta-alfa-alfa-beta dissulfeto-ligada. A ligação dos ligantes, tais como fator-I de crescimento similar à insulina (IGF-I) e fator-II de crescimento similar à insulina (IGF-II), através do domínio extracelular do receptor IGF-IR a ativa e, em muitos casos, seu domínio de tirosina quinase intracelular resulta em autofosforilação do receptor e fosforilação de substrato.

O IGF-IR é homólogo ao receptor de insulina, tendo uma alta similaridade de sequência de 84% no domínio de tirosina quinase de cadeia beta e uma baixa similaridade de sequência de 48% no domínio rico em cisteína extracelular de cadeia alfa (Ulrich, A. e outros, 1986, EMBO, 5, 2503-

2512; Fujita-Yamaguchi, Y. e outros, 1986, J. Biol. Chem., 261, 16727-16731; LeRoith, D. e outros, 1995, Endocrine Reviews, 16, 143-163). O IGF-IR e ligantes (IGF-I e IGF-II) exercem papéis importantes em numerosos processos fisiológicos, incluindo crescimento e desenvolvimento durante embriogênese, metabolismo, proliferação celular e diferenciação celular em adultos (LeRoith, D., 2000, Endocrinology, 141, 1287-1288; LeRoith, D., 1997, New England J. Med., 336, 633-640).

Os ligantes de IGF-I e IGF-II funcionam como hormônios endócrinos no sangue, onde eles estão predominantemente presentes em complexos com proteínas de ligação ao IGF e como fatores de crescimento parácrinos e autócrinos que são produzidos localmente (Humbel, R. E., 1990, Eur. J. Biochem., 190, 445-462; Cohick, W. S. e Clemmons, D. R., 1993, Anna Rev. Physiol. 55, 131-153).

In vivo, os níveis de IGF-I no soro são dependentes da presença do hormônio de crescimento pituitário (GH). Embora o fígado seja o principal local de síntese de IGF-I dependente de GH, um grande número de tecidos extra-hepáticos também produzem IGF-I (Daughaday e Rotwein, Endocrine Rev. 10: 68-91 (1989). Uma variedade de tecidos neoplásicos podem também produzir IGF-I (Werner e LeRoith, Adv. Cancer Res. 68: 183-223 (1996). Assim, o IGF-I pode atuar como um regulador de proliferação normal e anormal via mecanismos autócrinos ou parácrinos, bem como endócrinos. O IGF-I e IGF-II se ligam à proteínas de ligação ao IGF (IGFBPs) *in vivo*. Quando de ligação aos IGFs, as IGFBPs transportam IGFs através da circulação ou elas podem proteger os IGFs de clivagem proteolítica e inativação. A capacidade do IGF livre de interagir com o IGF-IR é modulada pelas IGFBPs. Para uma revisão de IGFBPs e IGF-I vide Grimberg e outros, J. Cell. Physiol. 183: 1-9, 2000.

A nível molecular, o IGF-IR foi implicado em promoção de crescimento, transformação e sobrevivência de células tumorais (Baserga, R. e outros, 1997, Biochem. Biophys. Acta, 1332, F105-F126; Blakesley, V. A. e outros, 1997, Journal of Endocrinology, 152, 339-344; Kaleko, M., Rutter, W. J. E Miller, A. D. 1990, Mol. Cell. Biol., 10, 464-473). Vários tipos de tumores

são conhecidos por expressar mais do que os níveis normais de IGF-IR, incluindo câncer de mama, câncer de cólon, carcinoma ovariano, sarcoma sinovial e câncer pancreático. Vide Khandwala, H. M. e outros, 2000, *Endocrine Reviews*, 21, 215-244; Werner, H. e LeRoith, D., 1996, *Adv. Cancer Res.*, 68, 183-223; Happerfield, L. C. e outros, 1997, *J. Pathol.*, 183, 412-417; Fri-
 5 er, S. e outros, 1999, *Gut*, 44, 704-708; van Dam, P. A. e outros, 1994, *J. Clin. Pathol.*, 47, 914-919; Xie, Y. e outros, 1999, *Cancer Res.*, 59, 3588-3591; Bergmann, U. e outros, 1995, *Cancer Res.*, 55, 2007-2011.

In vitro, foi mostrado que o IGF-I e IGF-II são mitógenos poten-
 10 tes para várias linhagens de células tumorais humanas, tais como câncer de pulmão, câncer de mama, câncer de cólon, osteosarcoma e câncer cervical (Ankrapp, D. P. e Bevan, D. R., 1993, *Cancer Res.*, 53, 3399-3404; Cullen, K. J., 1990, *Cancer Res.*, 50, 48-53; Hermanto, U. e outros, 2000, *Cell Growth & Differentiation*, 11, 655-664; Guo, Y. S. e outros, 1995, *J. Am. Coll.*
 15 *Surg.*, 181, 145-154; Kappel, C. C. e outros, 1994, *Cancer Res.*, 54, 2803-2807; Steller, M. A. e outros, 1996, *Cancer Res.*, 56, 1761-1765). Vários desses tumores e linhagens de células tumorais também expressam altos níveis de IGF-I ou IGF-II, o que pode estimular seu crescimento de maneira autócrina ou parácrina (Quinn, K. A. e outros, 1996, *J. Biol. Chem.*, 271, 11477-
 20 11483).

Estudos epidemiológicos mostraram uma correlação do nível elevado no plasma de IGF-I (e menor nível de proteína-3 de ligação ao IGF) com risco aumentado de câncer de próstata, câncer de cólon, câncer de pulmão e câncer de mama (Chan, J. M. e outros, 1998, *Science*, 279, 563-
 25 566; Wolk, A. e outros, 1998, *J. Natl. Cancer Inst.*, 90, 911-915; Ma, J. e outros, 1999, *J. Natl. Cancer Inst.*, 91, 620-625; Yu, H. e outros, 1999, *J. Natl. Cancer Inst.*, 91, 151-156; Hankinson, S. E. e outros, 1998, *Lancet*, 351, 1393-1396). Estratégias para diminuir o nível de IGF-I no plasma ou inibir a função do IGF-IR foram sugeridas para prevenção de câncer (Wu, Y. e ou-
 30 tros, 2002, *Cancer Res.*, 62, 1030-1035; Grimberg, A. e Cohen P., 2000, *J. Cell. Physiol.*, 183, 1-9).

O IGF-IR pode proteger as células tumorais de apoptose causa-

da por privação de fator de crescimento, independência de ancoragem ou tratamento com fármaco citotóxico (Navarro, M. e Baserga, R., 2001, *Endocrinology*, 142, 1073-1081; Baserga, R. e outros, 1997, *Biochem. Biophys. Acta*, 1332, F105-F126). Os domínios do IGF-IR que são críticos para suas atividades mitogênica, de transformação e antiapoptótica foram identificados através de análise mutacional. Por exemplo, o resíduo de tirosina 1251 foi identificado como crítico para as atividades antiapoptótica e de transformação, mas não para sua atividade mitogênica (O'Connor, R. e outros, 1997, *Mol. Cell. Biol.*, 17, 427-435; Miura, M. e outros, 1995, *J. Biol. Chem.*, 270, 22639-22644).

Dificuldade de Fazer um Produto Terapêutico Baseado em Antagonismo ou Inibição de IGF-IR

Embora o IGF-IR tenha biologia atraente como um alvo terapêutico, tentativas de fazer antagonistas ou outros tipos de inibidores têm sido lentas, grandemente em virtude de um ou mais dos seguintes fatores, dependendo do paradigma terapêutico: dificuldade ou incapacidade de antagonizar o alvo sem agonismo; dificuldade ou incapacidade de fazer antagonistas ou inibidores seletivos em virtude de reatividade cruzada indesejada com outros alvos ou receptores de tirosina quinase, tal como o receptor de insulina; dificuldade em administração eficaz em virtude da meia-vida curta do produto terapêutico potencial; dificuldade em administração eficaz em virtude de baixa solubilidade do produto terapêutico potencial; e dificuldade em administração eficaz em virtude de agregação do produto terapêutico potencial. Os produtos terapêuticos da invenção superam uma ou mais dessas dificuldades.

Células tumorais expressando um antissenso ao mRNA de IGF-IR sofrem apoptose massiva quando injetadas em animais em câmaras de biodifusão. Essa observação torna o IGF-IR um alvo terapêutico atraente, baseado na hipótese de que células tumorais são mais suscetíveis do que células normais à apoptose através de inibição de IGF-IR (Resnicoff, M. e outros, 1995, *Cancer Res.*, 55, 2463-2469; Baserga, R., 1995, *Cancer Res.*, 55, 249-252). Contudo, estratégias terapêuticas antissenso e de siRNA so-

frem dos obstáculos de desafios quanto à administração e custo potencial de produtos.

Outra estratégia para inibir a função de IGF-IR em células tumorais tem sido usar anticorpos anti-IGF-IR que se ligam ao domínio extracelular de IGF-IR e os quais podem inibir a ativação. Várias tentativas foram reportadas para desenvolver anticorpos monoclonais de camundongo contra o IGF-IR, dos quais dois anticorpos - IR3 e IH7 - estão disponíveis e seu uso foi reportado em vários estudos com IGF-IR.

O anticorpo IR3 foi desenvolvido usando um preparado placentário parcialmente purificado de receptor de insulina para imunizar camundongos, o que proporcionou um anticorpo, IR1, que era seletivo pela ligação ao receptor de insulina, e também dois anticorpos, IR2 e IR3, que mostraram imunoprecipitação preferencial de IGF-IR (receptor de somatomedina-C), mas também fraca imunoprecipitação de receptor de insulina (Kull, F. C. e outros, 1983, J. Biol. Chem., 258, 6561-6566).

Deficiências Exemplificativas de Anticorpos

Em alguns casos, anticorpos ativam o IGF-IR. Isso foi mostrado uma série de vezes na literatura. Além disso, anticorpos que são mostrados como "inibindo" podem não ter sido cuidadosamente caracterizados e podem, na verdade, ativar o IGF-IR sob determinadas condições, tal como uma menor concentração de anticorpo. Em um tumor onde provavelmente há um gradiente de difusão de anticorpo, a ativação de IGF-IR poderia ocorrer com anticorpos em menores concentrações de anticorpo no tumor.

O anticorpo IH7 foi desenvolvido para imunização de camundongos com preparado placentário purificado de IGF-IR, o que proporcionou um anticorpo inibitório, IH7, além de *três anticorpos estimulatórios* (Li, S.-L. e outros, 1993, Biochem. Biophys. Res. Commun., 196, 92-98; Xiong, L. e outros, 1992, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89, 5356-5360).

Em outro relato, um painel de anticorpos monoclonais de camundongo específicos para o IGF-IR humano foi obtido através de imunização de camundongos com células 3T3 transfectadas expressando altos níveis de IGF-IR, os quais foram classificados em sete grupos através de es-

tudos de competição por ligação e através de sua estimulação ou inibição de ligação de IGF-I à células 3T3 transfectadas (Soos, M. A. e outros, 1992, J. Biol. Chem., 267, 12955-12963).

Embora o anticorpo IR3 seja o anticorpo inibitório mais comu-
 5 mente usado para estudos com IGF-IR *in vitro*, ele sofre da deficiência de que ele *exibe atividade agonística* em células 3T3 e CHO transfectadas expressando IGF-IR humano (Kato, H. e outros, 1993, J. Biol. Chem., 268, 2655-2661; Steele-Perkins, G. e Roth, R. A., 1990, Biochem. Biophys. Res. Commun., 171, 1244-1251). Similarmente, dentre o painel de anticorpos de-
 10 senvolvidos por Soos e outros, os anticorpos 24-57 e 24-60 mais inibitórios também mostraram *atividades agonísticas* nas células 3T3 transfectadas (Soos, M. A. e outros, 1992, J. Biol. Chem., 267, 12955-12963). Embora tenha sido reportado que o anticorpo IR3 inibe a ligação de IGF-I (mas não IGF-II) a receptores expressos em células intactas e após solubilização, foi
 15 mostrado que ele inibe a capacidade do IGF-I e IGF-II de estimular a síntese de DNA em células *in vitro* (Steele-Perkins, G. e Roth, R. A., 1990, Biochem. Biophys. Res. Commun., 171, 1244-1251). O epítipo de ligação do anticorpo IR3 foi inferido a partir de construtos quiméricos de insulina-IGF-IR como sendo a região 223-274 do IGF-IR (Gustafson, T. A. e Rutter, W. J., 1990, J.
 20 Biol. Chem., 265, 18663-18667; Soos, M. A. e outros, 1992, J. Biol. Chem., 267, 12955-12963).

A linhagem de célula de câncer de mama humano MCF-7 é, tipicamente, usada como uma linhagem de célula modelo para demonstrar a resposta de crescimento ao IGF-I e IGF-II *in vitro* (Dufourny, B. e outros,
 25 1997, J. Biol. Chem., 272, 31163-31171). Em células MCF-7, o anticorpo IR3 bloqueia de modo incompleto o efeito estimulatório de IGF-I e IGF-II exogenamente adicionado em condições isentas de soro em aproximadamente 80%. Também, o anticorpo IR3 não inibe significativamente (menos de 25%) o crescimento de células MCF-7 em soro a 10% (Cullen, K. J. e outros,
 30 1990, Cancer Res., 50, 48-53). Essa fraca inibição de crescimento soro-estimulado de células MCF-7 pelo anticorpo IR3 *in vitro* pode estar relacionada aos resultados de um estudo *in vivo*, no qual tratamento com anticorpo

IR3 não inibiu significativamente o crescimento de um xenoenxerto de MCF-7 em camundongos nus (Arteaga, C. L. e outros, 1989, J. Clin. Invest, 84, 1418-1423).

Em virtude das fracas atividades agonísticas do IR3 e outros anticorpos reportados e sua incapacidade de inibir significativamente o crescimento de células tumorais, tais como células MCF-7, na condição mais fisiológica de estimulação com soro (ao invés de estimulação por IGF-I ou IGF-II exogenamente adicionado em condição isenta de soro), há uma necessidade de novos moduladores anti-IGF-IR que possam inibir o crescimento soro-estimulado de células tumorais sem atividade agonística significativa em si. Todavia, em alguns casos, atividade agonista será desejada, usualmente para aplicações fora de oncologia ou expansão, proliferação ou crescimento tecidual indesejados ou descontrolados.

Embora anticorpos anti-IGF-IR tenham sido reportados como presentes em determinados pacientes com doenças autoimunes, nenhum desses anticorpos foi purificado e nenhum foi mostrado ser adequado para inibição de atividade de IGF-I para procedimentos diagnósticos ou clínicos. Vide, por exemplo, Thompson e outros, *Pediat. Res.* 32: 455-459, 1988; Tappy e outros, *Diabetes* 37: 1708-1714, 1988; Weightman e outros, *Autoimmunity* 16: 251-257, 1993; Drexhage e outros, *Nether. J. of Med.* 45: 285-293, 1994. Adicionalmente, anticorpos monoclonais contra o IGF-IR foram reportados, os quais podem estimular a proliferação celular (Xiong e outros, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89: 5356-5360, 1992).

Adicionalmente, tem sido historicamente difícil fazer anticorpos e outros produtos terapêuticos em virtude de especificidade, agonismo, agregação e solubilidade, bem como produtos terapêuticos biespecíficos que incluem IGF-IR como um alvo, particularmente com o uso de anticorpos.

Deficiências Exemplificativas de Inibidores de Pequena Molécula

Programas de química de pequena molécula não têm obtido grande sucesso na criação de um produto terapêutico ao IGF-IR. A capacidade de formulação em fármaco desse alvo por proteínas e pequenas moléculas tem sido difícil por uma série de razões, incluindo a capacidade de ob-

ter química seletiva para o IGF-IR, ao mesmo tempo em que não inibe ou se liga à quinases ou receptores de tirosina relacionados, tal como o receptor de insulina. Além disso, as pequenas moléculas são, frequentemente, de baixa solubilidade, tornando a biodisponibilidade, administração ou formulação desafiadoras.

Apoptose e IGF-IR

Um de muitos aspectos da invenção é um polipeptídeo da invenção que se liga seletivamente ao IGF-IR para disparar a apoptose nas células de um tecido desejado, tal como um tumor. Biologia de IGF-IR, incluindo ativação, contribui para a regulação de apoptose. Ela pode diminuir ou prevenir a apoptose. Supressão do programa apoptótico por uma variedade de lesões genéticas pode contribuir para o desenvolvimento e progressão de malignidades.

As estratégias terapêuticas potenciais atuais, embora capazes de induzir à apoptose *in vitro* ou à inibição de proliferação celular *in vitro* associada a níveis aumentados de IGF-I, aumentados de IGF-II e/ou aumentados de receptor IGF-IR incluem supressão dos níveis de IGF-I ou dos níveis de IGF-II ou prevenção da ligação de IGF-I ao IGF-IR, continuam inadequadas para produtos terapêuticos melhores. Por exemplo, o análogo de somatostatina de longa ação octreotida foi empregado para reduzir a síntese e/ou secreção de IGF. IGF-IR solúvel tem sido usado para induzir à apoptose em células tumorais *in vivo* e inibir a tumorigênese em um sistema animal experimental (D'Ambrosio e outros, Cancer Res. 56: 4013-20, 1996). Além disso, oligonucleotídeos antissenso ao IGF-IR, análogos peptídicos de IGF-I e anticorpos ao IGF-IR têm sido usados para diminuir a expressão de IGF-I ou IGF-IR (vide *supra*). Contudo, nenhum desses agentes tem sido adequado para administração a longo prazo a pacientes humanos. Além disso, embora o IGF-I tenha sido administrado a pacientes para tratamento de baixa estatura, osteoporose, massa muscular diminuída, neuropatia ou diabetes, a ligação de IGF-I às IGFBPs tem, frequentemente, tornado o tratamento com IGF-I difícil ou ineficaz. Em vista dos papéis que o IGF-I, IGF-II e IGF-IR têm em distúrbios, incluindo câncer e distúrbios proliferativos, tal como quando

IGF-I ou IGF-II e/ou IGF-IR são superexpressos e das deficiências de outras abordagens terapêuticas (por exemplo, pequenas moléculas, siRNA, antis-senso e anticorpos), seria desejável gerar produtos terapêuticos, tais como polipeptídeos da invenção, à via do IGF-IR (ou várias isoformas ou mutantes do receptor ou seus ligantes) que possam modular, inibir ou bloquear seletivamente o IGF-IR.

Além disso, seria desejável que tal polipeptídeo fosse expresso de uma maneira com custo eficaz, possuísse propriedades biofísicas desejáveis (por exemplo, T_m , substancialmente monomérico ou bem duplicado), pequeno tamanho para penetrar em tecidos e meia-vida apropriada ou tempo de exposição *in vivo* no sangue com relação à afinidade de ligação pelo IGF-IR ou outros agentes.

SUMÁRIO DA INVENÇÃO

Um aspecto da invenção da invenção se refere a novos polipeptídeos que se ligam ao IGF-IR com alta afinidade. Em algumas modalidades, os polipeptídeos se ligam ao IGF-IR com uma constante de dissociação de cerca de 1 μ M ou menos, cerca de 10 nM ou menos ou cerca de 1 nM ou menos. Em algumas modalidades, os polipeptídeos se ligam ao receptor de insulina com uma constante de dissociação de cerca de 1 μ M ou mais. Em algumas modalidades, o polipeptídeo da invenção inibe a ligação de IGF-I ou IGF-II ao IGF-IR e não ativa o IGF-IR humano em concentrações abaixo da IC50 em um ensaio baseado em célula, com uma IC50 de menos de cerca de 1 nM ou cerca de 100 pM. Em algumas modalidades, o polipeptídeo da invenção induz à apoptose em um ensaio baseado em célula em uma linhagem de célula dependente de ativação de IGF-IR. Em algumas modalidades, ligantes de IGF-IR bloqueiam as atividades do IGF-IR, tais como controle de apoptose, fosforilação ou dimerização.

Frequentemente, será desejável, particularmente em aplicações *in vivo*, que as proteínas da invenção objetivando o IGF-IR, seja como um produto terapêutico monoespecífico ou multiespecífico (incluindo biespecífico ou triespecífico), sejam seletivas com relação ao IGF-IR comparado com o receptor de insulina. Tal seletividade é, de preferência, de pelo menos cer-

ca de 100 vezes, pelo menos cerca de 1000 vezes, pelo menos cerca de 10.000 vezes e pelo menos cerca de 100.000 vezes. Além disso, seria desejável, particularmente, que proteínas com alta afinidade pelo IGF-IR não se liguem detectavelmente ao receptor de insulina em uma concentração definida ou menor de produto terapêutico ou proteína, tais concentrações sendo de cerca de 100 nM, cerca de 1 μ M ou cerca de 10 μ M. Relações de seletividade de proteínas que se ligam ao IGF-IR com relação ao receptor de insulina também podem ser expressas comparando a K_d , IC50 e K_i 's, conforme medido ou calculado dependendo do ensaio; ou como uma proporção dos mesmos parâmetros bioquímicos ou biológicos (por exemplo, K_d , IC50 e K_i 's). Tais proporções incluem, de preferência, proporções de ligação ao receptor de insulina ou outra medição de ligação de IGF-IR ou outra medição de cerca de 100, cerca de 1.000, cerca de 10.000 ou cerca de 100.000. Outras proteínas da invenção que se ligam a outros alvos, particularmente receptores de tirosina quinase são, de preferência, seletivas pelo alvo desejado (por exemplo, EGFR ou Her2) comparado com o receptor de insulina usando a orientação de seletividade fornecida aqui.

Em algumas modalidades, o polipeptídeo compreende uma proteína de armação baseada em fibronectina. Em algumas modalidades, o polipeptídeo compreendendo um décimo domínio da fibronectina do tipo III (^{10} F_n3), em que o domínio ^{10} F_n3 (i) compreende uma alça; AB, uma alça, BC; uma alça, CD; uma alça, DE; uma alça EF; e uma alça FG; (ii) tem pelo menos uma alça selecionada da alça BC, DE e FG com uma sequência de aminoácido alterada com relação à sequência da alça correspondente do domínio ^{10} F_n3 humano e (iii) se liga ao IGF-IR humano com uma constante de dissociação de cerca de 1 μ M ou menos. Em algumas modalidades, pelo menos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 ou 10 aminoácidos em pelo menos uma alça selecionada da alça BC, DE e FG são substituídos por um aminoácido que difere da sequência do tipo silvestre. Em algumas modalidades, pelo menos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 ou 10 aminoácidos são deletados ou adicionados a pelo menos uma alça selecionada da alça BC, DE e FG. Em algumas modalidades, a alça BC e alça FG têm uma sequência de aminoácido alterada

com relação à sequência da alça correspondente do domínio ¹⁰F_n3 humano. Em algumas modalidades, o polipeptídeo compreende a sequência de aminoácido de qualquer uma de SEQ ID NOS: 2-125, 184-203 ou 226. Ligação substancialmente monovalente ao IGF-IR via armações baseadas em fibro-
5 nectina é útil na redução de ativação de IGF-IR nessa e em outras modalidades da invenção.

Em algumas modalidades, os polipeptídeos da invenção ainda compreendem uma ou mais porções farmacocinéticas (PK). Porções PK melhoram uma ou mais propriedades farmacocinéticas dos polipeptídeos, por
10 exemplo, biodisponibilidade, meia-vida no soro, estabilidade *in vivo* e distribuição de fármaco. Em algumas modalidades, a porção PK é selecionada de: uma porção de polioxialquileno, uma proteína de ligação à albumina de soro humano, ácido siálico, albumina de soro humano, transferrina e Fc ou um fragmento Fc. Em algumas modalidades, a porção PK é polietileno glicol
15 (PEG). Em algumas modalidades, a porção de PEG é covalentemente ligada ao polipeptídeo da invenção via um aminoácido Cys ou Lys. Em algumas modalidades, um polipeptídeo da invenção é ligado através de pelo menos uma ligação peptídica a uma segunda proteína que se liga à albumina de soro humano (HSA) com uma afinidade de ligação de cerca de 300 nM ou
20 menos.

Em algumas modalidades, os polipeptídeos da invenção ainda compreendem um segundo domínio que se liga a uma proteína humana. Em algumas modalidades, a proteína humana é selecionada de EGFR, receptor de folato, Her2, Her3, c-kit, c-Met, FGFR1, FGFR2, PDGFR, VEGFR1, VEG-
25 FR2, VEGF3, Tie2, Ang1, Ang2, FGF (fator de crescimento de fibroblasto), EGF (fator de crescimento epidérmico), HGF (fator de crescimento de hepatócito), VEGF-A (fator-A de crescimento endotelial vascular), VEGF-C e VEGF-D. Em algumas modalidades, a proteína humana é IGF-IR. Em algumas modalidades, a proteína humana é um receptor de tirosina. Em algumas
30 modalidades, o segundo domínio se liga a uma proteína humana com uma constante de dissociação de cerca de 1 μ M ou menos, cerca de 10 nM ou menos ou cerca de 1 nM ou menos. Em algumas modalidades, o segundo

domínio se liga ao VEGFR2 com uma constante de dissociação de cerca de 1 μ M ou menos, cerca de 10 nM ou menos ou cerca de 1 nM ou menos e se liga ao VEGFR1 com uma constante de dissociação de cerca de 1 μ M, 10 μ M ou 10 μ M ou mais.

5 Em algumas modalidades, o polipeptídeo compreende uma primeira e uma segunda proteína, quer uma ou ambas as proteínas sejam um anticorpo com uma única cadeia e as primeira e segunda proteínas são ligadas via uma porção de PEG. Em algumas modalidades, a primeira proteína se liga ao IGF-IR.

10 Em algumas modalidades, o segundo domínio é selecionado de: uma porção de anticorpo de menos do que cerca de 50 kDa; um derivado de lipocalina; um derivado de tetranectina; um avímero; um derivado de anquirina e um segundo décimo domínio de fibronectina do tipo III (^{10} F_n3), em que o segundo domínio ^{10} F_n3 compreende uma alça, AB; uma alça, BC; uma
15 alça, CD; uma alça, DE; e uma alça FG; e tem pelo menos uma alça selecionada da alça BC, DE e FG com uma sequência de aminoácido aleatória com relação à sequência da alça correspondente do domínio ^{10} F_n3 humano e se liga a uma proteína humana, a qual não é ligada pelo domínio ^{10} F_n3 humano, com uma constante de dissociação de cerca de 10 nM ou menos.

20 Em algumas modalidades, o segundo domínio é um domínio ^{10} F_n3 e compreende a sequência de aminoácido de qualquer uma de SEQ ID NOS: 2-203 ou 226. Em algumas modalidades, o polipeptídeo da invenção e o segundo domínio são operavelmente ligados via pelo menos uma ligação de dissulfeto, uma ligação peptídica, um polipeptídeo, um açúcar polimérico ou
25 uma porção de polietileno glicol (PEG). Em algumas modalidades, o PEG tem entre cerca de 0,5 kDa e cerca de 100 kDa.

Em algumas modalidades da invenção, os polipeptídeos da invenção compreendem uma primeira e segunda proteínas ligadas via um polipeptídeo, em que a primeira ou segunda proteína ou ligante polipeptídico
30 tem um sítio de protease que é clivável por uma protease no sangue ou tecido alvo. Tais modalidades podem ser usadas para liberar duas ou mais proteínas terapêuticas para melhor distribuição ou propriedades terapêuticas ou

produção mais eficiente comparado com a produção separadamente de tais proteínas.

Em algumas modalidades, uma primeira e segunda proteínas são ligadas usando um polímero biocompatível, tal como um açúcar polimérico. Tal açúcar polimérico pode incluir um sítio de de clivagem enzimática que é clivável por uma enzima no sangue ou tecido alvo. Tais modalidades podem ser usadas para liberar duas ou mais proteínas terapêuticas para melhor distribuição ou propriedades terapêuticas ou produção mais eficiente comparado com a produção separadamente de tais proteínas.

Outro aspecto da invenção é uma ligação operável de uma ou mais proteínas da invenção ou outras proteínas descritas aqui para fazer um produto terapêutico de proteína da invenção, via um polímero para criar proteínas multifuncionais. Por exemplo, o polímero poderia ser um polipeptídeo, açúcar polimérico, polímero baseado em carbono (por exemplo, cadeia alifática) ou PEG. Um aspecto adicional da invenção inclui ligação de uma proteína da invenção que se liga ao IGF-IR, conforme descrito aqui, com PEG à outra proteína, tal como: um Fab, um Ab com uma única cadeia, anticorpos com domínio, anticorpos de camelo e seus derivados (particularmente entidades de menos de cerca de 50 kDa), uma porção de anticorpo (por exemplo, menos de cerca de 50 kDa), uma Adteína (por exemplo, uma proteína entre 5 e 40 kDa que se liga a um alvo com uma especificidade desejada, ao mesmo tempo em que tem uma ou mais das propriedades farmacêuticas ou bioquímicas descritas aqui, particularmente aquelas relacionadas a receptores de tirosina quinase), uma proteína de armação baseada em fibronectina (por exemplo, uma Adnectin™) ou alternativas a anticorpos, tais como Avímeros, microcorpos, Transcorpos, Afficorpos, Affilinas™ ou trinectinas (por exemplo, tetranectinas) e outros derivados de proteínas, tais como lipocalina ou anquirina (DARPin). Em algumas modalidades, as primeira e segunda proteínas ligadas têm, coletivamente, 1 ou 0 ligações de dissulfeto. Isso pode ser desejável para melhorar a produção de proteína em sistemas baseados em células. De preferência, a referida primeira proteína se liga ao IGF-IR humano com uma afinidade de ligação de cerca de 100 pM ou menos e tem

pelo menos dois alças estruturais que participam na ligação da referida primeira proteína ao IGF-IR humano. De preferência, a referida segunda proteína é uma proteína de armação baseada em fibronectina ligada através de pelo menos uma ligação peptídica à referida primeira proteína. Em algumas modalidades, as referidas primeira proteína e segunda proteína são ligadas através de pelo menos uma ligação de dissulfeto. Embora isso possa ser realizado em células, pode ser desejado realizar essa ligação *in vitro* sem células. O polipeptídeo da invenção pode incluir uma primeira proteína que se liga ao IGF-IR humano com uma afinidade de ligação de cerca de 300 pM ou menos e tem pelo menos dois alças estruturais que participam na ligação da referida primeira proteína ao IGF-IR humano. De preferência, a referida primeira proteína se liga ao IGF-IR humano com uma afinidade de ligação de cerca de 1 nM ou menos e se liga ao receptor de insulina humano com uma afinidade de ligação de cerca de 1 μ M ou mais. De preferência, o polipeptídeo da invenção ainda compreende uma porção de PEG operavelmente ligado, seja através da referida primeira proteína ou a referida segunda proteína. De preferência, a referida segunda proteína se liga a um receptor de tirosina quinase humano super-regulado em um câncer humano, em que a referida segunda proteína se liga ao receptor de tirosina quinase humano com uma afinidade de ligação de cerca de 10 nM ou menos e se liga ao receptor de insulina humana com uma afinidade de ligação de cerca de 1 μ M ou mais.

Em algumas modalidades, o polipeptídeo da invenção pode compreender uma primeira proteína e a referida segunda proteína que têm, coletivamente, pelo menos 6 ligações de dissulfeto ou, em outro aspecto têm, coletivamente, pelo menos 8 ligações de dissulfeto. De preferência, a referida primeira proteína e a referida segunda proteína são um único polipeptídeo expresso a partir de um micróbio. De preferência, a referida primeira proteína se liga ao IGF-IR humano com uma afinidade de ligação de cerca de 100 pM ou menos e tem pelo menos duas alças estruturais que participam na ligação da referida primeira proteína ao IGF-IR humano. Em algumas modalidades, pelo menos uma da referida primeira proteína e da referi-

da segunda proteína é uma porção de anticorpo. De preferência, tal porção de anticorpo tem menos do que cerca de 50 kDa ou, em outro aspecto, tem menos do que cerca de 40 kDa. Em algumas modalidades, a porção de anticorpo é uma porção de anticorpo com uma única cadeia. O produto terapêutico de proteína inclui uma modalidade em que a referida segunda proteína se liga a uma das seguintes proteínas humanas: EGFR, receptor de folato, Her2, Her3, c-kit, c-Met, FGFR1, FGFR2, PDGFR, VEGFR1, VEGFR2, VEGF3 e Tie2; e ligantes: Ang1, Ang2, FGF, EGF, HGF, fator de célula tronco (SCF), VEGF-A, VEGF-C e VEGF-D. Em algumas modalidades, a primeira proteína e/ou a segunda proteína são um derivado de lipocalina. Em algumas modalidades, pelo menos uma da referida primeira proteína e da referida segunda proteína é um derivado de uma tetranectina. Em algumas modalidades, pelo menos uma da referida primeira porção de proteína e da referida segunda porção de proteína é um derivado de um avímero.

PEG pode ser usado em muitos aspectos da invenção e diferentes tamanhos podem ser usados conforme descrito aqui para o efeito terapêutico ou outro *in vivo* desejado, tal como formação de imagem. PEGs maiores são preferidos para aumentar a meia-vida no corpo, sangue, fluidos extracelulares não sanguíneos ou tecidos. Para atividade celular *in vivo*, PEGs da faixa de cerca de 10 a 60 kDa são preferidas, bem como PEGs de menos de cerca de 100 kDa e, mais preferivelmente, menos de cerca de 60 kDa, embora tamanhos maiores do que cerca de 100 kDa possam ser usados também. Para aplicação de formação de imagem *in vivo*, PEGs menores, geralmente de menos de cerca de 20 kDa, podem ser usados que não aumentam a meia-vida tanto quanto PEGs maiores, de modo a permitir distribuição mais rápida e menor meia-vida.

Em algumas modalidades, os polipeptídeos da invenção compreendem uma primeira proteína e uma segunda proteína operavelmente ligadas ao PEG através de uma única Cys ou Lys. Em algumas modalidades, pelo menos a primeira ou segunda proteína tem não mais do que uma única Cys ou Lys. Em algumas modalidades, a única Cys ou Lys está localizada na referida primeira ou segunda proteínas em uma localização que no

tipo não-silvestre na sequência de aminoácido.

Em algumas modalidades, o polipeptídeo da invenção compreende uma primeira e uma segunda proteína, em que a referida primeira proteína inibe a proliferação celular, tem uma T_m de pelo menos 55 °C e uma Cys ou Lys que do tipo não-silvestre na região de sua sequência de aminoácido que não interfere substancialmente com a ligação ao IGF-IR humano. Em algumas modalidades, a primeira proteína e a segunda proteína são um único polipeptídeo expresso a partir de um micróbio. Em algumas modalidades, a primeira proteína se liga ao IGF-IR humano com uma afinidade de ligação de cerca de 50 pM ou menos e tem pelo menos duas alças estruturais que participam na ligação da referida primeira proteína ao IGF-IR humano. Em algumas modalidades, o polipeptídeo da invenção tem uma meia-vida *in vivo* de pelo menos um dia com administração IV. Em algumas modalidades, o polipeptídeo da invenção tem um nível de exposição em uma concentração de pelo menos cerca de 10 vezes a afinidade de ligação da referida primeira proteína ao IGF-IR humano durante 24 horas em um roedor após administração. Em algumas modalidades, o polipeptídeo da invenção tem um nível de exposição durante 24 horas em um roedor após administração subcutânea. Em algumas modalidades, a primeira ou segunda proteína é uma proteína de armação baseada em fibronectina.

Uma variedade de afinidades dos polipeptídeos da invenção pelo IGF-IR, outras proteínas humanas ou porções PK podem ser usados, dependendo da aplicação diagnóstica, terapêutica, *in vivo* ou *in vitro*. Por exemplo, afinidades com uma constante de dissociação similares ou menos de cerca de 1 μ M, cerca de 100 nM, cerca de 10 nM, cerca de 1 nM, cerca de 100 pM, cerca de 10 pM, cerca de 1 pM ou cerca de 100 fM são preferidas, particularmente para o IGF-IR. Testagem *in vivo* de proteínas da invenção com diferentes afinidades pelo alvo desejado auxilia na seleção da afinidade desejada para aplicações *in vivo*. Testagem *in vitro* dependendo da presença de outras proteína e quantidades de IGF-IR podem, em geral, usar proteínas da invenção de diferentes afinidades comparado com aplicações *in vivo*. Frequentemente, menos afinidade ou ligação mais fraca pode ser usa-

da *in vitro*.

Em algumas modalidades, o polipeptídeo é um domínio $^{10}\text{Fn3}$ selecionado através do método compreendendo as etapas de a) produção de uma população de moléculas de RNA candidatas, cada uma compreendendo uma sequência do décimo domínio de fibronectina do tipo III ($^{10}\text{Fn3}$) candidato a qual difere da sequência de codificação do domínio $^{10}\text{Fn3}$, as referidas moléculas de RNA compreendendo, cada uma, uma sequência de início de tradução e um códon inicial operavelmente ligado à referida sequência de codificação de domínio $^{10}\text{Fn3}$ candidato e cada uma sendo operavelmente ligada a um ligante de ácido nucleico-puromicina na extremidade 3'; b) tradução *in vitro* das referidas sequências de codificação de domínio $^{10}\text{Fn3}$ para produzir uma população de fusões de RNA- $^{10}\text{Fn3}$ candidatas; c) contato da referida população de fusões de RNA- $^{10}\text{Fn3}$ candidatas com IGF-IR; e d) seleção de uma fusão de RNA- $^{10}\text{Fn3}$, a porção de proteína da qual tem uma afinidade ou especificidade de ligação pelo IGF-IR que é alterada com relação à afinidade ou especificidade de ligação do referido $^{10}\text{Fn3}$ humano pelo IGF-IR.

Um aspecto da invenção se refere a polipeptídeos compreendendo proteínas de armação baseadas em fibronectina que se ligam a um alvo humano. Em algumas modalidades, os polipeptídeos ainda compreendem porções PK conforme descrito aqui. A porção PK pode ser ligada à proteína de armação baseada em fibronectina através de qualquer ligante adequado, tal como aqueles descritos aqui.

Um aspecto da invenção proporciona um polipeptídeo da invenção capaz de inibir o crescimento de uma célula cancerígena em mais de cerca de 80 % na presença de um estimulante de crescimento tal como, por exemplo, soro, fator-I de crescimento similar à insulina e fator-II de crescimento similar à insulina.

Um outro aspecto da invenção proporciona composições farmacologicamente aceitáveis compreendendo os polipeptídeos da invenção, em que a composição é essencialmente isenta de endotoxina. De preferência, a composição é substancialmente isenta de contaminação microbiana, tornando

do-a adequada para administração *in vivo*. A composição pode ser formulada, por exemplo, para administração IV, IP ou subcutânea.

Um outro aspecto da invenção proporciona uma célula compreendendo um polinucleotídeo que codifica um ou mais polipeptídeos da invenção. Vetores contendo polinucleotídeos para tais proteínas são incluídos também. Sequências são, de preferência, otimizadas para maximizar a expressão no tipo de célula usado. De preferência, a expressão é em *E. coli*. Proteínas da invenção podem ser também expressas, por exemplo, em micróbios eucarióticos, incluindo levedo (por exemplo, *pichia* ou *cerevisiae*) ou algas verdes. Células de levedo podem ser manipuladas para produzir glicosilações desejadas sobre qualquer uma das proteínas descritas aqui. As células da invenção podem ser uma célula de mamífero. Em um aspecto, a célula de mamífero pode ser manipulada para produzir glicosilação desejada sobre qualquer uma das proteínas descritas aqui. Em um aspecto, a célula expressa uma proteína de armação baseada em fibronectina. Em um aspecto, os polinucleotídeos que codificam proteínas de armação baseadas em fibronectina têm o códon otimizado para expressão no tipo de célula selecionado.

Um aspecto da invenção proporciona métodos para o tratamento de um indivíduo tendo um câncer através de administração de um novo polipeptídeo da presente invenção, seja sozinho ou em combinação com outros agentes citotóxicos ou terapêuticos. O câncer pode ser um ou mais, por exemplo, de câncer de mama, câncer de cólon, carcinoma ovariano, osteosarcoma, câncer cervical, câncer de próstata, câncer de pulmão, carcinoma sinovial, câncer pancreático ou outro câncer ainda a ser determinado nos quais os níveis de IGF-IR estão elevados, super-regulados, com mutação ou alterados quanto à fisiológica comparado com células não-oncogênicas.

Outro aspecto da invenção proporciona métodos para o tratamento de um indivíduo tendo um câncer através de administração de um polipeptídeo da invenção, seja sozinho ou em combinação com outros agentes citotóxicos ou terapêuticos. Em particular, agentes citotóxicos e terapêuticos incluem docetaxel, paclitaxel, doxorubicina, epirubicina, ciclofosfamida,

trastuzumab, capecitabina, tamoxifeno, toremifeno, letrozola, anastrozola, fulvestrant, exemestano, goserelina, oxaliplatina, carboplatina, cisplatina, dexametasona, antida, bevacizumab, 5-fluorouracila, leucovorina, levamisola, irinotecan, etoposídeo, topotecan, gemcitabina, vinorelbina, estramustina, mitoxantrona, abarelix, zoledronato, estreptozocina, rituximab, idarubicina, busulfan, clorambucila, fludarabina, imatinib, citarabina, ibritumomab, tositumomab, interferon alfa-2b, melphalam, bortezomib, altretamina, asparaginase, gefitinib, erlonitib, anticorpo antirreceptor de EGF (por exemplo, cetuximab ou panitumumab), ixabepilona e uma epotilona ou derivado dos mesmos. Mais preferivelmente, o agente terapêutico é um agente de platina (tal como carboplatina, oxaliplatina, cisplatina), um taxano (tal como paclitaxel, docetaxel), gemcitabina ou camptotecina.

Além disso, pode ser preferido combinar um polipeptídeo da invenção com uma segunda proteína terapêutica como uma única molécula ou talvez como uma única molécula com uma terceira proteína terapêutica. Tal entidade terapêutica compreende uma proteína da invenção ligada através de PEG ou outro polímero (por exemplo, dissulfeto Cys-Cys ou polipeptídica) a uma ou mais proteínas terapêuticas. Tais proteínas terapêuticas incluem derivados de anticorpo (por exemplo, Fabs, anticorpos de camelo e seus derivados, anticorpos com domínio (por exemplo, menos de cerca de 50 kDa de tamanho) e cadeias únicas (de preferência menos de cerca de 50 kDa de tamanho)), Adnectins™ e proteínas, de preferência na faixa de ~5 a ~40 kDa.

Alvos de proteínas da invenção incluem particularmente versões humanizadas embora, em alguns casos, espécies modelo, tais como camundongo, rato, macaco e cão: IGF-IR, FGFR1, FGFR2, FGFR3, FGFR4, c-Kit, tirosina quinase similar ao receptor de p185 humana (HER2 ou Her2), Her3, c-Met, receptor de folato, PDGFR, VEGFR1, VEGFR2, VEGFR3, fator de crescimento endotelial vascular humano (VEGF) A, VEGF C, VEGF D, CD20 humana, CD18 humana, CD11a humana, receptor-2 de apoptose humano (Apo-2), integrina .alfa.4.beta.7 humana, integrina GPIIb-IIIa humana, fator de célula tronco (SCF), receptor de fator de crescimento epidérmico

humano (EGFR) e CD3 humana. Além disso, aspectos da invenção incluem proteínas multifuncionais que se ligam a um primeiro alvo e pelo menos um outro alvo. De preferência, tais proteínas são ligadas por PEG na invenção descrita aqui embora, em muitas modalidades, tais proteínas possam ser ligadas através de polipeptídeos ou outros ligantes poliméricos ou ligantes não-poliméricos.

Proteínas estavelmente ligadas da invenção podem ser de uso para o tratamento terapêutico de câncer. Proteínas multiespecíficas da invenção têm a vantagem de modulação, bloqueio ou inibição de mais de um alvo terapêutico quando dirigidas a 2, 3, 4 ou mais alvos terapêuticos ou epítopos.

É previsto que qualquer tipo de tumor e qualquer tipo de antígeno tumoral pode ser objetivado com a biológica correspondente do produto terapêutico. O câncer pode ser um ou mais, por exemplo, de câncer de mama, câncer de cólon, carcinoma ovariano, osteosarcoma, câncer cervical, câncer de próstata, câncer de pulmão, carcinoma sinovial, câncer pancreático, melanoma, mieloma múltiplo, neuroblastoma e rabdomiosarcoma ou outro câncer ainda a ser determinado no qual os níveis de IGF-IR estão elevados, super-regulados, com mutação ou alterados quanto à fisiologia comparado com células não-oncogênicas.

Outros tipos exemplificativos de tumores que podem ser objetivados incluem leucemia linfoblástica aguda, leucemia mielogênea aguda, câncer biliar, câncer de mama, câncer cervical, leucemia linfocítica crônica, leucemia mielogênea crônica, câncer cólon-retal, câncer endometrial, câncer esofageal, gástrico, de cabeça e pescoço, linfoma de Hodgkin, câncer de pulmão, câncer de tireoide medular, linfoma não-Hodgkin, mieloma múltiplo, câncer renal, câncer ovariano, câncer pancreático, glioma, melanoma, câncer de fígado, câncer de próstata e câncer de bexiga urinário.

Adicionalmente, alvos tumor-associados podem ser objetivos pelos polipeptídeos da invenção. Em algumas modalidades, objetivação de antígeno ajudará a localizar os efeitos do produto terapêutico em termos de distribuição tecidual ou concentração local aumentada no tecido ou tipo de

célula desejado. Alternativamente, se pode proporcionar um mecanismo adicional de ação para combater câncer junto com um ou mais alvos descritos aqui para os quais um produto terapêutico é feito. Tais antígenos ou alvos incluem, mas não estão limitados a, anidrase carbônica IX, A3, antígeno específico para anticorpo A33, antígeno BrE3, CD1, CD1a, CD3, CD5, CD15, CD16, CD19, CD20, CD21, CD22, CD23, CD25, CD30, CD45, CD74, CD79a, CD80, HLA-DR, NCA 95, NCA90, HCG e suas subunidades, CEA (CEACAM-5), CEACAM-6, CSAp, EGFR, EGP-1, EGP-2, Ep-CAM, Ba 733, HER2/neu, fator induzível por hipóxia (HIF), antígeno KC4, antígeno KS-1, KS1-4, Le-Y, fator de inibição de macrófago (MIF), MAGE, MUC1, MUC2, MUC3, MUC4, antígeno PAM-4, PSA, PSMA, RS5, S100, TAG-72, p53, tenascina, IL-6, IL-8, fator-I de crescimento de insulina (IGF-I), fator-II de crescimento de insulina (IGF-II), antígeno Tn, antígenos de Thomson-Friedenreich, antígenos de necrose de tumor, fator de crescimento placentário (P1GF), antígeno 17-1A, um marcador 5 de angiogênese (por exemplo, fibronectina ED-B), um marcador de oncogene, um produto de oncogene e outros antígenos tumor-associados. Relatos recentes sobre os antígenos associados a tumor incluem Mizukami e outros, (2005, *Nature Med.* 11: 992-97); Hatfield e outros, (2005, *Curr. Cancer Drug Targets* 5: 229-48); Vallbohmer e outros (2005, *J. Clin. Oncol.* 23: 3536-44); e Ren e outros (2005, *Ann. Surg.* 242: 55-63), cada um dos quais incorporado por referência.

Em outras modalidades, um agente antiangiogênico pode formar uma porção de um produto terapêutico e pode ser operavelmente ligado a uma proteína da invenção. Agentes antiangiogênicos exemplificativos para uso incluem angiostatina, baculostatina, canstatina, maspina, anticorpos ou peptídeos anti-VEGF, anticorpos ou peptídeos antifator de crescimento placentário, anticorpos anti-Flk-1, anticorpos ou peptídeos anti-Fit-1, peptídeos de laminina, peptídeos de fibronectina, inibidores de ativador de plasminogênio, inibidores de metaloproteinase tecidual, interferons, interleucina 12, IP-10, Gro.-beta., trombospondina, 2-metoxiestradiol, proteína relacionada à proliferina, carboxiamidotriazola, CM 101, Marismastat, polissulfato de pento-
sana, angiopoietina 2, interferon-alfa, herbimicina A, PNU145156E, fragmen-

to 16K de prolactina, Linomida, talidomida, pentoxifilina, genisteína, TNP-470, endostatina, paclitaxel, acutina, angiostatina, cidofovir, vincristina, bleomicina, AGM-1470, fator 4 de plaqueta ou minociclina.

Outro aspecto da invenção proporciona kits compreendendo um ou mais dos elementos descritos aqui e instruções para o uso desses elementos. Em uma modalidade preferida, um kit da presente invenção inclui uma proteína da invenção, sozinha ou com um segundo agente terapêutico. As instruções para essa modalidade preferida incluem instruções para inibição do crescimento de uma célula cancerígena usando uma proteína da invenção, sozinha ou com um segundo agente terapêutico e/ou instruções para um método de tratamento de um paciente tendo um câncer usando o mesmo.

Outro aspecto da invenção proporciona uma composição de matéria baseada em proteína compreendendo uma primeira proteína que se liga especificamente ao IGF-IR humano; em que a referida primeira proteína tem entre cerca de 4kD e cerca de 40 kD de MW, tem menos do que cerca de 30 por cento de identidade de aminoácido ao IGF-I ou IGF-II humano e é substancialmente isenta de contaminação bacteriana, tornando-a adequada para administração *in vivo*. Em algumas modalidades, a composição de matéria ainda compreende uma porção PK, tal como PEG ou uma proteína que se liga à albumina de soro humano. Em algumas modalidades, a primeira proteína tem uma constante de dissociação de cerca de 1 nM ou menos pelo IGF-IR humano. Em algumas modalidades, a composição de matéria bloqueia a ligação de IGF-I ou IGF-II ao IGF-IR.

Outro aspecto da invenção proporciona uma composição de matéria baseada em proteína compreendendo uma primeira proteína que se liga ao IGF-IR humano com uma afinidade de ligação de cerca de 10 nM ou menos e se liga ao receptor de insulina humana com uma afinidade de ligação de cerca de 1 μ M ou maior; em que a referida primeira proteína é substancialmente um único domínio que tem ligação substancialmente monovalente com relação ao IGF-IR humano e é substancialmente isenta de contaminação bacteriana, tornando-a adequada para administração *in vivo*. Em

algumas modalidades, a composição de matéria ainda compreende uma segunda proteína ligada, através de uma ligação peptídica, à referida primeira proteína, em que a referida segunda proteína se liga ao IGF-IR com uma afinidade de ligação de cerca de 10 nM ou menos e se liga ao receptor de insulina humana com uma afinidade de ligação de cerca de 1 μ M ou maior.

5 Em algumas modalidades, a composição de matéria ainda compreende uma segunda proteína ligada, através de pelo menos uma ligação peptídica, à referida primeira proteína, em que a referida segunda proteína se liga à albumina de soro humano com uma afinidade de ligação de cerca de 300 nM

10 ou menos. Em algumas modalidades, a composição de matéria ainda compreende uma segunda proteína ligada através de PEG à referida primeira proteína, em que a referida segunda proteína se liga ao IGF-IR humano com uma afinidade de ligação de cerca de 10 nM ou menos e se liga ao receptor de insulina humana com uma afinidade de ligação de cerca de 1 μ M ou maior.

15 Em algumas modalidades, a primeira ou segunda proteínas compreende uma proteína de armação baseada em fibronectina.

Outro aspecto da invenção proporciona uma composição de matéria baseada em PEG compreendendo um primeiro PEG ligado a uma primeira proteína que se liga ao IGF-IR humano com uma afinidade de ligação

20 de cerca de 100 nM e uma segunda proteína que se liga a uma proteína humana; em que o referido PEG tem entre cerca de 0,5 kD e cerca de 100 kD e a referida composição de matéria é substancialmente isenta de PEG e é substancialmente isenta de contaminação bacteriana, tornando-a adequada para administração *in vivo*. Em algumas modalidades, a segunda proteína

25 se liga a pelo menos um receptor de tirosina humana ou pelo menos um ligante do receptor de tirosina humana com uma afinidade de ligação de cerca de 1 nM ou menos e se liga ao receptor de insulina humana com uma afinidade de ligação de cerca de 1 μ M ou maior. Em algumas modalidades, uma ou ambas as proteínas são uma proteína de armação baseada em fi-

30 bronectina.

Outro aspecto da invenção proporciona uma composição de matéria baseada em proteína compreendendo uma primeira proteína que se

liga ao IGF-IR humano operavelmente ligada a uma segunda proteína que se liga a uma proteína humana; em que a referida primeira proteína se liga ao IGF-IR humano com uma afinidade de ligação de cerca de 10 nM ou menos e se liga ao receptor de insulina humano com uma afinidade de ligação de cerca de 1 μ M ou mais e é substancialmente isenta de contaminação bacteriana, tornando-a adequada para administração *in vivo*. Em algumas modalidades, a composição de matéria baseada em proteína ainda compreende uma porção de PEG operavelmente ligada à referida primeira proteína ou referida segunda proteína. Em algumas modalidades, a segunda proteína se liga a um receptor de tirosina quinase humano super-regulado em um câncer humano, em que a referida segunda proteína se liga ao receptor de tirosina humano com uma afinidade de ligação de cerca de 10 nM ou menos e se liga ao receptor de insulina humano com uma afinidade de ligação de cerca de 1 μ M ou mais.

Outro aspecto da invenção proporciona um produto terapêutico de proteína compreendendo uma primeira porção de proteína que se liga ao IGF-IR humano operavelmente ligada a uma segunda porção de proteína que se liga a um alvo terapêutico humano; em que a referida primeira proteína se liga ao IGF-IR humano com uma afinidade de ligação de cerca de 10 nM ou menos e se liga ao receptor de insulina humano com uma afinidade de ligação de cerca de 1 μ M ou mais e é substancialmente isenta de contaminação bacteriana, tornando-a adequada para administração *in vivo*; e ainda em que a referida proteína se liga ao alvo terapêutico humano com uma afinidade de ligação de cerca de 10 nM ou menos e se liga ao receptor de insulina humano com uma afinidade de ligação de cerca de 1 μ M ou mais e é substancialmente isenta de contaminação bacteriana, tornando-a adequada para administração *in vivo*. Em algumas modalidades, a primeira proteína e a segunda proteína são um único polipeptídeo expresso a partir de um micróbio.

Outro aspecto da invenção proporciona um produto terapêutico de proteína compreendendo uma primeira porção de proteína que se liga ao IGF-IR humano operavelmente ligada a um PEG que é operavelmente ligado

a uma segunda porção de proteína que se liga a um agente terapêutico humano; em que a referida primeira porção de proteína se liga ao IGF-IR humano com uma afinidade de ligação de cerca de 10 nM ou menos e se liga ao receptor de insulina humano com uma afinidade de ligação de cerca de 1 μ M ou mais e é substancialmente isenta de contaminação bacteriana, tornando-a adequada para administração *in vivo*; e ainda em que a referida segunda porção de proteína se liga ao alvo terapêutico humano com uma afinidade de ligação de cerca de 10 nM ou menos e se liga ao receptor de insulina humano com uma afinidade de ligação de cerca de 1 μ M ou mais e é substancialmente isenta de contaminação bacteriana, tornando-a adequada para administração *in vivo*. Em algumas modalidades, a primeira porção de proteína e a segunda porção de proteína têm, coletivamente, pelo menos 6 ligações de dissulfeto.

Outro aspecto da invenção proporciona um produto terapêutico de proteína compreendendo uma primeira porção de proteína que se liga ao IGF-IR humano operavelmente ligada a um PEG que é operavelmente ligado a uma segunda porção de proteína que se liga a um alvo terapêutico humano; em que a referida primeira porção de proteína se liga ao IGF-IR humano com uma afinidade de ligação de cerca de 10 nM ou menos e se liga ao receptor de insulina humano com uma afinidade de ligação de cerca de 1 μ M ou mais e a ligação com relação ao IGF-IR humano é substancialmente monovalente e é substancialmente isenta de contaminação bacteriana, tornando-a adequada para administração *in vivo*; e ainda em que a referida segunda porção de proteína se liga ao alvo terapêutico humano com uma afinidade de ligação de cerca de 10 nM ou menos e se liga ao receptor de insulina humana com uma afinidade de ligação de cerca de 1 μ M ou mais e a ligação com relação ao IGF-I humano é substancialmente monovalente e é substancialmente isenta de contaminação microbiana, tornando-a adequada para administração *in vivo*.

Outro aspecto da invenção proporciona um produto terapêutico de proteína compreendendo uma primeira porção de proteína que se liga ao IGF-IR humano operavelmente ligado a um polímero biocompatível que é

operavelmente ligado a uma segunda porção de proteína que se liga a um alvo terapêutico humano; em que a referida primeira porção de proteína se liga ao IGF-IR humano com uma afinidade de ligação de cerca de 10 nM ou menos e se liga ao receptor de insulina humano com uma afinidade de ligação de cerca de 1 μ M ou mais e é substancialmente isenta de contaminação bacteriana, tornando-a adequada para administração *in vivo*; ainda em que a referida segunda porção de proteína se liga ao alvo terapêutico humano com uma afinidade de ligação de cerca de 10 nM ou menos e se liga ao receptor de insulina humano com uma afinidade de ligação de cerca de 1 μ M ou mais e é substancialmente isenta de contaminação bacteriana, tornando-a adequada para administração *in vivo*; e ainda em que a referida primeira porção de proteína e a segunda porção de proteína têm afinidades por seus respectivos alvos que são otimizadas para minimizar efeitos não-terapêuticos e maximizar o benefício terapêutico de ligação a um ou mais alvos terapêuticos. Em algumas modalidades, o polipeptídeo tem um sítio de protease que é clivável por uma protease no sangue ou tecido alvo.

Outro aspecto da invenção proporciona um produto terapêutico de proteína compreendendo uma primeira proteína que se liga ao IGF-IR humano operavelmente ligada a um PEG que é operavelmente ligado a uma segunda proteína que se liga a uma proteína humana; em que a referida primeira proteína se liga ao IGF-IR humano com uma afinidade de ligação de cerca de 10 nM ou menos e se liga ao receptor de insulina humano com uma afinidade de ligação de cerca de 1 μ M ou mais e é substancialmente isenta de contaminação bacteriana, tornando-a adequada para administração *in vivo*; e ainda em que a referida segunda porção de proteína se liga ao alvo terapêutico humano com uma afinidade de ligação de cerca de 10 nM ou menos e se liga ao receptor de insulina humano com uma afinidade de ligação de cerca de 1 μ M ou mais e é substancialmente isenta de contaminação bacteriana, tornando-a adequada para administração *in vivo*. Em algumas modalidades, a primeira proteína inibe a proliferação celular, tem uma T_m de pelo menos 55 °C e Cys ou Lys que do tipo não-silvestre na região de sua sequência de aminoácido que não interfere substancialmente com a ligação

ao IGF-IR humano. Em algumas modalidades, o produto terapêutico de proteína tem uma meia-vida *in vivo* de pelo menos um dia com administração IV. Em algumas modalidades, o produto terapêutico de proteína tem um nível de exposição em uma concentração de pelo menos cerca de 10 vezes a

5 afinidade de ligação da referida primeira proteína ao IGF-IR humano durante 24 horas em um roedor após administração. Em algumas modalidades, a primeira e/ou segunda proteínas é uma armação baseada em fibronectina.

Outro aspecto da invenção proporciona uma célula compreendendo um polinucleotídeo que codifica uma ou mais proteínas descritas aqui.

10 Em algumas modalidades, a célula é um levedo manipulado para produzir glicosilações desejadas sobre qualquer uma das proteínas descritas aqui. Em algumas modalidades, a célula é uma alga verde. Em algumas modalidades, a célula é uma célula de mamífero manipulada para produzir glicosilações desejadas sobre qualquer uma das proteínas descritas aqui. Em al-

15 gumas modalidades, a proteína é uma armação baseada em fibronectina e tem, opcionalmente, um códon de polinucleotídeo otimizado para expressão em uma célula.

BREVE DESCRIÇÃO DAS FIGURAS

Figura 1. Perfil de seleção para isolamento de clones que se li-

20 gam ao IGF-IR humano. É mostrado um gráfico ilustrando um aumento na ligação percentual ao IGF-IR durante o curso de um experimento PROfusion com uma biblioteca de proteínas com domínio de armação de fibronectina aleatória. Uma biblioteca de um trilhão de fusões de proteína-cDNA/mRNA foi ligada ao IGF-IR biotinilado a 100 nM em solução e capturada sobre gló-

25 bulos magnéticos revestidos de estreptavidina. O cDNA foi eluído, amplificado através de PCR e usado para gerar uma nova biblioteca de fusões de proteína-cDNA/mRNA. 5 ciclos de PROfusion foram realizados dessa maneira e o percentual de bibliotecas que se ligam ao IGF-IR foi monitorado através de PCR quantitativa.

30 Figura 2. SDS PAGE de clones competitivos de IGF-IR humano. É mostrado um gel de SDS PAGE mostrando Adnectinas competitivas de IGF-IR humano purificado através de HTPP, conforme descrito no Exemplo

35. Amostras são carregadas sobre um minigel NuPAGE a 10% e coradas usando Sypro-orange.

Figura 3. SDS PAGE de etapas de purificação do clone 238C04 competitivo de IGF-IR. Um gel de SDS PAGE ilustrando uma purificação em escala mediana típica e a qualidade do produto final de uma proteína com domínio de armação de fibronectina competitivo de IGF-IR, o clone protótipo 218C04, nesse caso, conforme descrito no Exemplo 35. As amostras foram carregadas sobre um minigel NuPAGE a 10% e coradas usando Sypro-orange.

Figura 4. Cromatografia por exclusão de tamanho do clone 218C04 competitivo de IGF-IR humano. Um cromatograma de exclusão por aqueles versados na técnica de um protótipo de proteína com domínio de armação de fibronectina competitivo de IGF-IR humano representativo, especificamente do clone 218C04. Detalhes da cromatografia são descritos no Exemplo 35. Detecção por fluorescência foi empregada.

Figura 5. Otimização do clone competitivo de IGF-IR humano 218C04. Esquema ilustrando as etapas de otimização típicas para os protótipos de proteína com domínio de armação de fibronectina de IGF-IR humano nesse exemplo. A Figura 5a mostra os resultados de 3 bibliotecas obtidas através de randomização de uma alça cada do clone 218C04. Bibliotecas de um trilhão de fusões de mRNA/cDNA-proteína foram ligadas a IGF-IR biotinilado a 100 nM em solução e capturadas sobre glóbulos magnéticos revestidos com estreptavidina. O cDNA foi eluído, amplificado através de PCR e usado para gerar novas bibliotecas de fusões de mRNA/cDNA-proteína. Os processos de construção da biblioteca e seleção por afinidade foram repetidos até que o percentual de ligação ao IGF-IR excedesse a 1%, conforme medido através de PCR quantitativa. Nesse ponto, as alças otimizadas foram amplificadas e recombinados para fazer uma nova biblioteca contendo todos os três alças otimizadas (Figura 5b). Fusões de mRNA/cDNA-proteína dessa biblioteca foram capturadas sobre glóbulos revestidos com IGF-IR, seguido por 3 ciclos de PROfusion™ com IGF-IR biotinilado a 1 nM. Em cada caso, o percentual de ligação foi medido através de PCR quantitativa (Fi-

gura 5c).

Figura 6. Ensaio competitivo de IGF-I/IGF-IR do clone otimizado 218C04. Um gráfico mostrando exemplos de proteínas com domínio de armação de fibronectina otimizadas com capacidade aperfeiçoada de inibir a interação entre IGF-I e IGF-IR em um ELISA competitivo, conforme descrito no Exemplo 35.

Figura 7. SDS PAGE do clone otimizado 218C04 selecionado, clones de IGF-IR purificados. É mostrado um gel de SDS PAGE mostrando Adnectinas competitivas de IGF-IR humano derivadas da otimização de protótipos e purificadas através de HTPP, conforme descrito no Exemplo 35. As amostras são carregadas sobre um minigel NuPAGE a 10% e coradas usando Sypro-orange.

Figura 8. Calorimetria por exploração diferencial do clone de IGF-IR competitivo otimizado 338A06. Calorimetria por exploração diferencial (DSC) de um clone de IGF-IR competitivo representativo, clone 338A06 nesse caso. O traço preto são os dados brutos, o traço vermelho é a adaptação. DSC foi conduzida conforme descrito no Exemplo 35.

Figura 9. SEC do clone competitivo otimizado 338A06. Um cromatograma por exclusão de tamanho de uma proteína com domínio de armação de fibronectina competitivo de IGF-IR humano representativo derivada do processo de otimização, especificamente o clone 338A06. Um cromatograma por exclusão de tamanho de uma proteína com domínio de armação de fibronectina competitivo de IGF-IR humano representativo derivada de um processo de otimização, especificamente o clone 338A06. Detalhes da cromatografia são descritos no Exemplo 35. Detecção por fluorescência foi empregada.

Figura 10. SEC MALLS do clone competitivo otimizado de IGF-IR, 339A06. Análise por SEC MALLS do clone de proteína com domínio de armação de fibronectina 338A06. Plotagem do tempo de eluição versus a massa molar para o pico de eluição. A proporção de Rayleigh é o excesso de luz dispersa acima daquela dispersa pelo solvente apenas (detector a 90° mostrado apenas).

Figura 11. Espectrometria de massa do clone competitivo de IGF-IR, 338A06. MALDI MS do clone competitivo de IGF-IR humano, 338A06. Preparo de amostra e condições experimentais são conforme descrito no Exemplo 35.

5 Figura 12. Ensaio de proliferação de IGF-I do clone 338A06. Um gráfico representando a inibição de mitogênese mediada por IGF-I por um clone competitivo de ligação ao IGF-IR humano selecionado, clone 338A06 nesse caso. Uma comparação com um Mab anti-IGF-IR de neutralização comercialmente disponível (MAB391) foi incluído. A linhagem de célula de
10 adenocarcinoma pancreático humano BxPC-3 foi usada, conforme descrito no Exemplo 3.

 Figura 13. Ensaio de inibição de IGF-IR do clone competitivo 338A06. Um gráfico representando a ruptura da interação entre o IGF-I e IGF-IR por um clone competitivo de ligação ao IGF-IR humano, clone
15 338A06 nesse caso. Uma comparação com o IGF-I e um Mab anti-IGF-IR de neutralização comercialmente disponível (MAB391) foi incluída. A linhagem de adenocarcinoma de mama humano MCF-7 foi usada, conforme descrito no Exemplo 35.

 Figura 14. Ensaio de ligação ao IGF-IR de clones otimizados com alça FG, clone 338A06. Um gráfico mostrando a atividade do clone otimizado com alça FG 338A06 em um ELISA de ligação direto, conforme descrito no Exemplo 35.

 Figura 15. SECS do clone competitivo de IGF-IR otimizado com alça FG 338A06. Cromatogramas por exclusão de tamanho de oito clones
25 competitivos de IGF-I otimizados com alça FG 338 A06. As condições de cromatografia são descritas no Exemplo 29. Detecção por fluorescência foi empregada.

 Figura 16. SEC do clone otimizado com alça FG de IGF-IR 387B01. Um cromatograma por exclusão de tamanho de um clone competitivo de IGF-I otimizado com alça FG humano 338A06 representativo purificado ao nível de escala mediana, especificamente o clone 387B01. Detalhes
30 da cromatografia são descritos no Exemplo 35. Detecção por fluorescência

foi empregada.

Figura 17. RP-HPLC do clone otimizado com alça FG de IGF-IR 387B01. Um cromatograma por RP-HPLC de um clone competitivo de IGF-IR otimizado com alça FG humano 338A06 representativo purificado a nível
5 de escala mediana, especificamente o clone 387B01. Detalhes da cromatografia são descritos no Exemplo 35. Detecção a A280 nm foi empregada.

Figura 18. Espectrometria de massa por MALDI TOF do clone otimizado com alça FG de IGF-IR 387B01. MALDI MS de um clone competitivo otimizado com alça FG de IGF-IR humano representativo, 338A06 purificado a nível de escala mediana, especificamente o clone 387B01. Preparo
10 de amostra e condições experimentais são conforme descrito no Exemplo 35.

Figura 19. SDS PAGE de proteínas PEGuiladas. É mostrado um gel de SDS PAGE mostrando as variantes com PEGuilação de 385A08. As
15 condições de PEGuilação são conforme descrito no Exemplo 35. As amostras são carregadas sobre um minigel NuPAGE a 10% e coradas usando Sypro-orange.

Figura 20. Ensaio baseado em célula de variantes de IGF-IR humano PEGuiladas. Um gráfico representando a inibição de proliferação
20 mediada por soro por variantes de PEGuilação de IGF-IR selecionadas do clone 385A08. A linhagem de célula de plasmacitoma humano NCI-H929 foi usada, conforme descrito no Exemplo 35.

Figura 21. Ensaio baseado em célula de multímeros de IGF-IR. Um gráfico representando a inibição de proliferação mediada por IGF por
25 clones selecionados de armação de fibronectina que se ligam ao IGF-IR. A linhagem de célula linfocítica manipulada 32D:IGF-IR foi colocada em lâminas com 96 cavidades em uma concentração de 10000 células por cavidade em RPMI (Invitrogen, Carlsbad, CA) contendo soro bovino fetal a 10% (HyClone, Logan, UT) na presença de 100 ng/mL de IGF e várias concentrações
30 de cada antagonista de IGF-IR (● anticorpo monoclonal de IGF-IR MAB391; ■ clone de ligação ao IGF-IR 385A08 (SEQ ID NO: 226); o Dois clones de ligação ao IGF-IR (SEQ ID NO: 203) ligados por PEG: 385A08-PEG20-

385A08; ▲ Dois clones de ligação ao IGF-IR (SEQ ID NO: 203) ligados por uma ligação de dissulfeto: 385A08-SS-385A08).

Figura 22. Ensaio baseado em célula de multímeros de IGF-IR/VEGFR2. Um gráfico representando a inibição de proliferação mediada por soro por clones selecionados de armação de fibronectina que se ligam ao IGF-IR. A linhagem de célula de plasmacitoma humano NCI-H929 (ATCC, Manassas, VA) foi colocada em lâminas com 96 cavidades em uma concentração de 25000 células por cavidade em DMEM (Invitrogen, Carlsbad, CA) contendo soro bovino fetal a 10% (Hyclone, Logan, UT) na presença de várias concentrações de cada antagonista de IGF-IR (● anticorpo monoclonal anti-IGF-IR MAB391, R&D Systems, Minneapolis, MN; o Clone de ligação ao IGF-IR 385A08 (SEQ ID NO: 203); ▲ Clones de ligação ao VEGFR2/IGF-IR (SEQ ID NO: 203) ligados através de PEG: 385A08-PEG20-SEQ ID NO: 128; ■ Clone de ligação ao VEGFR2 (SEQ ID NO: 128).

Figura 23. Ensaio de VEGFR2 baseado em célula de multímeros de IGF-IR/VEGFR2. Um gráfico representando a inibição de proliferação mediada por VEGF por clones selecionados de armação de fibronectina de ligação ao IGF-IR. A linhagem de célula pro-B manipulada hKE8-3 (Ba/F3:VEGFR2) foi colocada em lâminas com 96 cavidades em uma concentração de 25000 células por cavidade em RPMI (Invitrogen, Carlsbad, CA) contendo soro bovino fetal a 10% (Hyclone, Logan, UT) na presença de 5 ng/mL de VEGF e várias concentrações de cada um dos antagonistas de VEGFR2 (● Clone de ligação ao VEGFR2 SEQ ID NO: 128; o SEQ ID NO: 227 de controle; ▲ Clones de ligação ao VEGFR2/IGF-IR (SEQ ID NO: 203) ligados por PEG: 385A08-PEG20-SEQ ID NO: 128).

Figura 24. V_H e estruturas com domínio $^{10}Fn3$. A organização estrutural é representada para um polipeptídeo com um único domínio tendo uma duplicação de imunoglobulina (um domínio V_H de uma imunoglobulina, lado esquerdo) e um polipeptídeo com um único domínio tendo uma duplicação similar à imunoglobulina (um domínio $^{10}Fn3$, lado direito).

Figura 25. Avaliação do ligante de IGF-IR de armação de fibronectina ligado à HSA. Um gráfico representando a inibição de proliferação

mediada por soro por clones de armação de fibronectina selecionados que se ligam ao IGF-IR. A linhagem de célula de plasmacitoma humano NCI-H929 (ATCC, Manassas, VA) foi colocada em lâminas com 96 cavidades em uma concentração de 25000 células por cavidade em DMEM (Invitrogen, Carlsbad, CA) contendo soro bovino fetal a 10% (Hyclone, Logan, UT) na presença de várias concentrações de cada antagonista de IGF-IR (● Anticorpo monoclonal anti-IGF-IR MAB391, R&D Systems, Minneapolis, MN; o Clonede ligação ao IGF-IR 385A08 (SEQ ID NO:203); ▲ HSA-385A08 (SEQ ID NO:203); ■ Albumina de Soro Humano (HSA, Invitrogen, Carlsbad, CA)). As células foram deixadas proliferar durante 72 horas a 37 °C, 5% de CO₂. Após o período de proliferação, as células foram expostas ao Cell Titer 96 Aqueous Proliferation Reagent (Promega, Madison, WI) e deixadas incubar durante mais quatro horas. A absorbância a 490 nm foi medida em um Spectramax Plus 384 (Molecular Devices, Sunnyvale, CA) e os dados resultantes foram analisados usando SigmaPlot (Systat Software, Point Richmond, CA).

Figura 26. Inibição de crescimento de tumor *in vivo* por construtos de IGF-IR. O volume mediano do tumor (mg) (eixo y) é plotado contra dias pós-implante do tumor (eixo x). Os triângulos na parte inferior do eixo x indicam as doses administradas. Composto IGFIIR (um antagonista de IGF-IR); 385A08 (SEQ ID NO: 226); 385A08-PEG20-385A08 (SEQ ID NO: 203-PEG20-SEQ ID NO: 203); 385A08-PEG40 (SEQ ID NO: 203); e 385A08-HSA (SEQ ID NO: 203) demonstram graus variados de inibição de tumor em um modelo de xenoenxerto Rh41.

Figura 27. Inibição de crescimento de tumor *in vivo* por construtos de IGF-IR. O número de dias para atingir um tamanho de tumor de grupo mediano de 500 mg (eixo y) é plotado contra os diferentes grupos de tratamento, conforme descrito na Figura 26 (eixo x). O tempo médio para que o grupo atinja o tamanho alvo é indicado pelas linhas horizontais. * $p \leq 0,05$ ou *** $p \leq 0,0005$ com relação ao tempo para atingir 500 mg com relação ao controle.

Figura 28. Caracterização do construto de fusão de IGF-IR-Fc. O painel superior mostra um gel de SDS PAGE com marcadores de peso mo-

lecular na coluna mais à esquerda, seguido por IGF-IR-Ig não-reduzida (fileira 1), IGF-IR-Ig tratada com endo-H (fileira 2) e Endo H (fileira 3). O pequeno desvio para a menor massa quando de tratamento com endo H indica que a proteína IGF-IR-Ig tem uma pequena quantidade de glicosilação. O painel inferior mostra um gel de SDS PAGE, mas na presença de agente de redução, com marcadores de peso molecular na coluna mais à esquerda, seguido por IGF-IR-Ig não-tratada (fileira 1), IGF-IR-Ig tratada com endo-H (fileira 2), IGF-IR-Ig tratada com endo-H e SDS (fileira 3) e Endo H (fileira 4). Conforme pode ser visto, a massa observada é cerca de metade do tamanho das amostras não-reduzidas, conforme é esperado para uma IGF-IR-Ig intacta dissulfeto-ligada.

Figura 29. Representa uma Western blot empregada para avaliar a capacidade de 385A08-Fc de inibir a fosforilação por AKT e MAPK de IGF-IR em células de rhabdomyosarcoma humano Rh41. As células foram estimuladas com IGF-I, IGF-II, ligantes de insulina (50 ng/ml) ou sem estimulação (NS) e, então, tratadas com várias concentrações de 385A08-Fc (SEQ ID NO: 226). As membranas foram hibridizadas com anticorpos conforme indicado, bem como anticorpos fosfo-específico.

Figura 30. Representa as sequências de aminoácido do décimo módulo do tipo silvestre do domínio de fibronectina do tipo III humano (SEQ ID NO: 1), os clones competitivos de IGF-IR identificados no Exemplo 2 (SEQ ID NOs: 2-109), os clones 218C04 otimizados do Exemplo 8 (SEQ ID NOs: 110-125), polipeptídeos ¹⁰F_n3 de ligação ao VEGFR-2 exemplificativos (SEQ ID NOs: 126-183), os clones 388A06 otimizados do Exemplo 18 (SEQ ID NOs: 184-202), o clone de ligação ao IGF-IR de controle 385A08 da Figura 21 (SEQ ID NO: 226), a proteína de armação de fibronectina de controle da Figura 23 (SEQ ID NO: 227), proteínas de fusão de HSA-IGF-IR exemplificativas (SEQ ID NOs: 228-235) e proteínas de fusão de transferrina-IGF-IR exemplificativas (SEQ ID NOs: 236-243). As alças BC, DE e FG estão sombreados em SEQ ID NOs: 1-125.

DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO

Definições

A metodologia descrita aqui foi usada com sucesso para desenvolver proteínas da invenção que incluem, mas não estão limitadas a, polipeptídeos de ligação com IGF-IR com um único domínio derivados de pelo menos dois grupos relacionados de estruturas de proteína: aquelas proteínas tendo uma duplicação de imunoglobulina e aquelas proteínas tendo uma duplicação similar à imunoglobulina.

Por "polipeptídeo" entenda-se qualquer sequência de dois ou mais aminoácidos, a despeito do comprimento, modificação pós-traducional ou função. "Polipeptídeo", "peptídeo" e "proteína" são usados permutavelmente aqui. Polipeptídeos podem incluir aminoácidos naturais e aminoácidos não-naturais, tais como aqueles descritos na Patente U.S. No. 6.559.126, incorporada aqui por referência. Polipeptídeos também podem ser modificados através de uma variedade de formas químicas padrões (por exemplo, um aminoácido pode ser modificado com um grupo de proteção; o aminoácido carbóxi-terminal pode ser transformado em um grupo amida terminal; o resíduo amino-terminal pode ser modificado com grupos, por exemplo, para intensificar a lipofilicidade; ou o polipeptídeo pode ser quimicamente glicosilado ou de outro modo modificado para aumentar a estabilidade ou meia-vida *in vivo*). Modificações de polipeptídeo incluem a fixação de outra estrutura, tal como um composto cíclico ou outra molécula, ao polipeptídeo e pode também incluir polipeptídeos que contêm um ou mais aminoácidos em uma configuração alterada (isto é, R ou S; ou L ou D). O termo "polipeptídeo com um único domínio" é usado para indicar que a atividade de ligação ao alvo (por exemplo, atividade de ligação ao IGF-IR) do polipeptídeo em questão está localizada dentro de um único domínio estrutural, conforme diferenciado, por exemplo, de anticorpos e anticorpos com uma única cadeia, onde a atividade de ligação a antígeno geralmente é contribuída por um domínio variável de cadeia pesada e um domínio variável de cadeia leve. Considera-se que uma pluralidade de polipeptídeos com um único domínio do tipo descrito aqui podem ser conectados para criar uma molécula composta com atividade aumentada. Da mesma forma, um polipeptídeo com um único domínio pode ser preso (por exemplo, como uma proteína de fusão) a qualquer nú-

mero de outros polipeptídeos, tais como polipeptídeos fluorescentes, polipeptídeos de objetivação e polipeptídeos tendo um efeito terapêutico distinto.

O termo "PK" é um acrônimo para "farmacocinética" e abrange propriedades de um composto incluindo, à guisa de exemplo, absorção, distribuição, metabolismo e eliminação por um indivíduo. Uma "proteína de modulação de PK" ou "porção PK" se refere a qualquer proteína, peptídeo ou porção que afeta as propriedades farmacocinéticas de uma molécula biologicamente ativa quando fundida a ou administrada junto com a molécula biologicamente ativa. Exemplos de uma proteína de modulação de PK ou porção PK incluem PEG, ligantes de albumina de soro humano (HSA) (conforme descrito nas Publicações U.S. Nos. 20050287153 e 20070003549), albumina de soro humano, Fc ou fragmentos Fc e açúcares (por exemplo, ácido siálico).

Polipeptídeos com um único domínio da armação de imunoglobulina ou similar à imunoglobulina tenderão a compartilhar determinadas características estruturais. Por exemplo, o polipeptídeo pode compreender entre cerca de 80 e cerca de 150 aminoácidos, aminoácidos os quais são estruturalmente organizados em um conjunto de fitas beta ou beta-similares, formando beta folhas, onde as fitas beta ou beta-similares são conectadas através de porções de alça intervenientes. Exemplos da organização estrutural para o domínio variável de cadeia pesada e o domínio ¹⁰F_n3 ao mostrados na Figura 24. As beta folhas formam o núcleo estável dos polipeptídeos com um único domínio, ao mesmo tempo em que criam sítios de ligação de ligante padronizados e, com controle apropriado, tais variações podem ser geradas sem romper a estabilidade global da proteína. Em anticorpos, três dessas alças são Regiões de Determinação de Complementaridade (ou "CDRs") bem-conhecidas.

Armações para formação de polipeptídeos com um único domínio deverão ser altamente solúveis ou estáveis em condições fisiológicas. Exemplos de armações de imunoglobulina são a armação com domínio único de V_H ou V_L, bem como o domínio V_{HH} de camelídeo com um único domí-

nio (uma forma de domínio variável pesado encontrado em camelídeos) ou outros domínios variáveis de imunoglobulina encontrados na natureza ou manipulados no laboratório. No formato com um único domínio descrito aqui, um polipeptídeo de imunoglobulina não precisa formar um dímero com um
5 segundo polipeptídeo de forma a obter atividade de ligação. Consequentemente, qualquer um de tais polipeptídeos que contêm naturalmente uma cisteína a qual media a ligação cruzada de dissulfeto a uma segunda proteína pode ser alterado para eliminar a cisteína. Alternativamente, a cisteína pode ser retida para uso na conjugação de porções adicionais, tal como PEG, ao
10 polipeptídeo com único domínio.

Outras armações podem ser proteínas de armação de não-anticorpo. Por "proteína de armação ou domínio de não-anticorpo" entenda-se um polipeptídeo de não-anticorpo tendo uma duplicação similar à imunoglobulina. "Duplicação similar à imunoglobulina" significa um domínio de proteína de entre cerca de 80-150 resíduos de aminoácido que inclui duas camadas de beta-folhas antiparalelas e no qual as faces hidrofóbicas planas das duas beta-folhas são acondicionadas uma contra a outra. Um exemplo de tal armação é a "proteína de armação baseada em fibronectina", pelo qual entenda-se um polipeptídeo baseado em um domínio de fibronectina do
15 tipo III (Fn3). Um exemplo de proteínas de armação baseadas em fibronectina são Adnectinas™ (Adnexus Therapeutics, Inc.). A fibronectina é uma grande proteína a qual exerce papéis essenciais na formação de matriz extracelular e interações célula-célula; ela consiste em muitas repetições de três tipos (tipos I, II e III) de pequenos domínios (Baron e outros, 1991). Fn3
20 em si é o paradigma de uma grande subfamília a qual inclui porções de moléculas de adesão celular, receptores de citocina e hormônios na superfície celular, chaperonização e domínios de ligação de carboidrato. Para revisões vide Bork & Doolittle, Proc Natl Acad Sci USA. 1 de Outubro de 1992; 89(19): 8990-4; Bork e outros, J Mol Biol. 30 de Setembro de 1994; 242(4): 309-20;
25 Campbell & Spitzfaden, Structure. 15 de Maio de 1994; 2(5): 333-7; Harpez & Chothia, J Mol Biol. 13 de Maio de 1994; 238(4): 528-39).

De preferência, a proteína de armação baseada em fibronectina

é uma armação "10Fn3", pelo que entenda-se uma variante polipeptídica baseada no décimo módulo da proteína fibronectina do tipo III humana, no qual um ou mais das alças acessíveis a solvente foram randomizados ou sofreram mutação, particularmente um ou mais das três alças identificadas

5

como a alça BC (aminoácidos 23-30), alça DE (aminoácidos 52-56) e alça FG (aminoácidos 77-87) (o esquema de numeração é baseado na sequência do décimo módulo do tipo silvestre do domínio de fibronectina do tipo III hu-

mana):
VSDVPRDLEVVAATPTSLISWDAPAVTVRYRITYGETGGNSPVQEFTVP

10

GSKSTATISGLKPGVDYTITGYAVTGRGDSPASSKPISINYRT (SEQ ID NO:1). De preferência, proteínas de armação baseadas em fibronectina são baseadas em SEQ ID NO: 1.

Uma variedade de armações de 10Fn3 mutantes foi reportada.

Em um aspecto, um ou mais de Asp 7, Glu 9 e Asp 23 é substituído por outro aminoácido tal como, por exemplo, um resíduo de aminoácido não-negativamente carregado (por exemplo, Ans, Lys, etc.). Essas mutações fo-

15

ram reportadas como tendo um efeito de promoção de maior estabilidade do ¹⁰F_n3 mutante em um pH neutro quando comparado com a forma do tipo silvestre (vide Publicação PCT No. WO02/04523). Uma variedade de altera-

20

ções adicionais na armação de 10Fn3 que são benéficas ou neutras foi descrita. Vide, por exemplo, Batori e outros, Protein Eng. Dezembro de 2002; 15(12): 1015-20; Koide e outros, Biochemistry, 28 de Agosto de 2001; 40(34): 10326-33.

Proteínas de ¹⁰F_n3 variantes e do tipo silvestre são caracteriza-

25

das pela mesma estrutura, isto é, sete sequências com domínio em beta-fita designadas A a G e seis regiões de alça (alça AB, alça BC, alça CD, alça DE, alça EF e alça FG) as quais conectam as sete sequências com domínio de beta-fita. As beta fitas posicionadas mais próximas dos N- e C-términos podem adotar uma conformação beta-similar em solução. Em SEQ ID NO: 1,

30

a alça AB corresponde aos resíduos 15-16, a alça BC corresponde aos resíduos 22-30, a alça CD corresponde aos resíduos 39-45, a alça DE corresponde aos resíduos 51-55, a alça EF corresponde aos resíduos 60-66 e a

alça FG corresponde aos resíduos 76-87. Conforme mostrado na Figura 24, a alça BC, alça DE e alça FG estão todas localizadas na mesma extremidade do polipeptídeo. Similarmente, armações de imunoglobulina tendem a ter pelo menos sete fitas beta ou beta-similares e frequentemente nove fitas beta ou beta-similares. Proteínas de armação baseadas em fibronectina podem incluir outros domínios de fibronectina do tipo Fn3, na medida em que eles exibam atividades úteis e propriedades similares aos domínios do tipo ¹⁰Fn3.

Um polipeptídeo com um único domínio descrito aqui pode ter pelo menos cinco a sete fitas beta ou beta-similares distribuídas entre pelo menos duas beta folhas e pelo menos uma porção de alça que conecta duas fitas beta ou beta-similares, porção de alça a qual participa na ligação ao IGF-IR, com a ligação caracterizada por uma constante de dissociação que é menor do que 1×10^{-6} M e, de preferência, menor do que 1×10^{-8} M. Conforme descrito aqui, polipeptídeos tendo uma constante de dissociação de menos de 5×10^{-9} M são particularmente desejáveis para uso terapêutico *in vivo* para inibir a sinalização a ligante. Polipeptídeos tendo uma constante de dissociação de entre 1×10^{-6} M e 5×10^{-9} M podem ser desejáveis para uso na detecção ou rotulação, *ex vivo* ou *in vivo*, de proteínas de IGF-IR.

20 Opcionalmente, a "proteína de ligação ao IGF-IR" se ligará especificamente ao IGF-IR com relação a outras proteínas da mesma espécie. Por "se liga especificamente" entenda-se um polipeptídeo que reconhece e interage com uma proteína alvo (por exemplo, IGF-IR), mas que não reconhece substancialmente e interage com outras moléculas em uma amostra, por exemplo, uma amostra biológica. Em modalidades preferidas, um polipeptídeo da invenção se ligará especificamente a um IGF-IR com uma K_D de pelo menos 500 nM. De preferência, o polipeptídeo se ligará especificamente a um IGF-IR com uma K_D de 1 pM a 500 nM, mais preferivelmente 1 pM a 100 nM, mais preferivelmente 1 pM a 10 nM e, mais preferivelmente, 1 pM a 1 nM ou menor.

Uma "região Fc funcional" possui pelo menos uma "função efetuada" de uma região Fc de sequência nativa. Funções efetuidoras exem-

plificativas incluem ligação a C1q; citotoxicidade complemento-dependente (CDC); ligação ao receptor de Fc; citotoxicidade célula-mediada anticorpo-dependente (ADCC); fagocitose; subregulação de receptores na superfície celular (por exemplo, um receptor de célula B; BCR), etc. Tais funções efetuadoras geralmente requerem que a região Fc seja combinada com um domínio de ligação (por exemplo, um domínio variável de anticorpo) e podem ser avaliadas usando vários ensaios conhecidos na técnica para avaliação de tais funções efetuadoras de anticorpo.

Uma "região Fc de sequência nativa" compreende uma sequência de aminoácido idêntica à sequência de aminoácido de uma região Fc encontrada na natureza. A figura 3 proporciona sequências de aminoácido das regiões Fc de IgG de murino e humana nativas.

Uma "região Fc variante" compreende uma sequência de aminoácido a qual difere daquela de uma região Fc de sequência nativa em virtude de pelo menos uma modificação de aminoácido. De preferência, a região Fc variante tem pelo menos uma substituição de aminoácido comparado com uma região Fc de sequência nativa ou a região Fc de um polipeptídeo precursor, por exemplo, de cerca de uma a cerca de dez substituições de aminoácido e, de preferência, de cerca de uma a cerca de cinco substituições de aminoácido em uma região Fc de sequência nativa ou na região Fc do polipeptídeo precursor. A região Fc variante aqui possuirá, de preferência, pelo menos cerca de 80% de identidade de sequência com uma região Fc de sequência nativa e/ou com uma região Fc de um polipeptídeo precursor e, mais preferivelmente, pelo menos cerca de 90% de identidade de sequência com a mesma, mais preferivelmente pelo menos cerca de 95% de identidade de sequência com a mesma.

"Citotoxicidade célula-mediada anticorpo-dependente" e "ACC" se referem a uma reação célula-mediada na qual células citotóxicas não-específicas que expressam receptores de Fc (FcRs) (por exemplo, células Assassinas Naturais (NK), neutrófilos e macrófagos) reconhecem um anticorpo ligado sobre uma célula alvo e, subsequentemente, causam a lise da célula alvo. As células primárias para mediação de ADCC, células NK, ex-

pressam Fc γ RIII apenas, enquanto que monócitos expressam Fc γ RI, Fc γ RII e Fc γ RIII. Expressão de FcR sobre células hematopoiéticas é resumida na Tabela 3 na página 464 de Ravetch e Kinet, Annu. Rev. Immunol 9: 457-92 (1991). Para avaliar a atividade de ADCC de uma molécula de interesse, um
5 ensaio de ADCC *in vitro*, tal como aquele descrito nas Patentes U.S. Nos. 5.500.362 ou 5.821.337, pode ser realizado. Células efetadoras úteis para tais ensaios incluem células mononucleares de sangue periférico (PBMC) e células Assassinas Naturais (NK). Alternativa ou adicionalmente, a atividade de ADCC da molécula de interesse pode ser avaliada *in vivo*, por exemplo,
10 em um modelo animal, tal como aquele descrito em Clynes e outros PNAS (USA) 95: 652-656 (1998).

"Identidade percentual (%)" de sequência de aminoácido" aqui é definida como o percentual de resíduos de aminoácido em uma sequência candidata que são idênticos aos resíduos de aminoácido em uma sequência
15 selecionada, após alinhamento das sequências e introdução de espaçamentos, se necessário, para obter a identidade percentual máxima de sequência e não considerando quaisquer substituições conservativas como parte da identidade de sequência. Alinhamento para fins de determinação da identidade de sequência de aminoácido pode ser obtido de várias formas que es-
20 tão dentro da capacidade na técnica, por exemplo, usando softwares de computador publicamente disponíveis, tais como os softwares BLAST, BLAST-2, ALIGN, ALIGN-2 ou Megalign (DNASTAR). Aqueles versados na técnica podem determinar parâmetros apropriados para medição de alinhamento, incluindo quaisquer algoritmos necessários para obter alinhamento
25 máximo sobre o comprimento total das sequências que estão sendo comparadas. Para as finalidades aqui, contudo, os valores de identidade % de sequência de aminoácido são obtidos conforme descrito abaixo usando o programa de computador para comparação de sequência ALIGN-2. O programa de computador para comparação de sequência ALIGN-2 foi autorizado pela
30 Genentech, Inc. e foi depositado junto com a documentação de usuário no U.S. Copyright Office, Washington D.C., 20559, onde ele foi registrado sob o Registro de Copyright No. TXU510087 e está publicamente disponível da

Genentech, Inc., South San Francisco, Calif. O programa ALIGN-2 deverá ser compilado para uso sobre um sistema operacional UNIX, de preferência UNIX digital V4.0D. Todos os parâmetros de comparação de sequência são ajustados pelo programa ALIGN-2 e não variam.

- 5 Para as finalidades aqui, a identidade % de sequência de aminoácido de uma determinada sequência de aminoácido A com ou contra uma determinada sequência de aminoácido B (a qual pode, alternativamente, ser denominada como uma determinada sequência de aminoácido A que tem ou compreende uma determinada identidade % de sequência de amino-
- 10 ácido com ou contra uma determinada sequência de aminoácido B) é calculada como segue: 100 vezes a fração X/Y onde X é o número de resíduos de aminoácido classificados como combinações idênticas pelo programa de alinhamento de sequência ALIGN-2 pelo alinhamento do programa de A e B e onde Y é o número total de resíduos de aminoácido em B. Será apreciado
- 15 que, onde o comprimento da sequência de aminoácido A não é igual ao comprimento da sequência de aminoácido B, a identidade % de sequência de aminoácido de A para B não será igual à identidade % de sequência de B para A.

20 Uma "cadeia polipeptídica" é um polipeptídeo em que cada um dos domínios do mesmo é unido a outro(s) domínio(s) através de ligação(ões) peptídica(s), em oposição à interações não covalentes ou ligações de dissulfeto.

25 Um polipeptídeo "isolado" é um que foi identificado e separado e/ou recuperado de um componente de seu ambiente natural. Componentes contaminantes desse ambiente natural são materiais que interferirão com os usos diagnósticos ou terapêuticos para o polipeptídeo e podem incluir enzimas, hormônios e outros solutos proteináceos ou não-proteináceos. Em modalidades preferidas, o polipeptídeo será purificado (1) para mais de 95% em peso do polipeptídeo, conforme determinado através do método de Lowry e,

30 mais preferivelmente, mais de 99% em peso, (2) até um grau suficiente para obter pelo menos 15 resíduos de sequência de aminoácido N-terminal ou interna usando um Spinning Cup Sequenator ou (3) até homogeneidade a-

través de SDS-PAGE sob condições de redução ou não-redução usando azul Coomassie ou, de preferência, corante de prata. Polipeptídeo isolado inclui o polipeptídeo *in situ* dentro de células recombinantes, uma vez que pelo menos um componente do ambiente natural do polipeptídeo não estará presente. Comumente, contudo, o polipeptídeo isolado será preparado através de pelo menos uma etapa de purificação.

Alvos também podem ser fragmentos dos referidos alvos. Assim, um alvo é também um fragmento do referido alvo capaz de estimular uma resposta imune. Um alvo é também um fragmento do referido alvo capaz de se ligar a um anticorpo com um único domínio estimulado contra o alvo de comprimento total.

Um fragmento, conforme usado aqui, se refere a menos de 100% da sequência (por exemplo, 99%, 90%, 80%, 70%, 60%, 50%, 40%, 30%, 20%, 10%, etc.), mas compreendendo 5, 6, 7, 8, 9, 10, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25 ou mais aminoácidos. Um fragmento é de um comprimento suficiente, de modo que a interação de interesse seja mantida com uma afinidade de 1×10^{-6} ou melhor.

Um fragmento, conforme usado aqui, também se refere à inserções, deleções e substituições opcionais de um ou mais aminoácidos as quais não alteram substancialmente a capacidade do alvo de se ligar a um anticorpo com um único domínio estimulado contra o alvo do tipo silvestre. O número de inserções, deleções ou substituições de aminoácido é, de preferência, de até 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69 ou 70 aminoácidos.

Uma proteína da invenção que "induz à morte celular" é uma a qual faz com que uma célula viável se torna inviável. A célula é, geralmente, uma a qual expressa o antígeno ao qual a proteína se liga, especialmente onde a célula superexpressa o antígeno. De preferência, a célula é uma célula cancerígena, por exemplo, uma célula de mama, ovariana, estômago, endometrial, glândula salivar, pulmão, rim, cólon, tireoide, pancreática ou be-

xiga. *In vitro*, a célula pode ser, por exemplo, uma célula SKBR3, BT474, Calu 3, MDA-MB453, MDA-MB-361 ou SKOV3. A morte celular *in vitro* pode ser determinada na ausência de complemento e células efetadoras imunes para distinguir a morte celular induzida por citotoxicidade célula-mediada anticorpo-dependente (ADCC) ou citotoxicidade complemento-dependente (CDC). Assim, o ensaio para morte celular pode ser realizado usando soro inativado termicamente (isto é, na ausência de complemento) e na ausência de células efetadoras imunes. Para determinar se a proteína da invenção é capaz de induzir à morte celular, perda de integridade de membrana, conforme avaliado através de captação de iodeto de propídio (PI), azul de tripano (vide Moore e outros Cytotechnology 17: 1-11 (1995)) ou 7AAD podem ser avaliados com relação à células não-tratadas.

Uma proteína da invenção que "induz à apoptose" é uma que induz à morte celular programada, conforme determinado através de ligação de moléculas ou eventos relacionados à apoptose, tais como anexina V, fragmentação de DNA, retração celular, dilatação do retículo endoplasmático, fragmentação celular e/ou formação de vesículas na membrana (denominados corpos apoptóticos). A célula é uma a qual expressa o antígeno ao qual a proteína se liga e pode ser uma a qual superexpressa o antígeno. A célula pode ser uma célula tumoral, por exemplo, uma célula de mama, ovariana, estômago, endometrial, glândula salivar, pulmão, rim, cólon, tireoide, pancreática ou bexiga. *In vitro*, a célula pode ser, por exemplo, uma célula SKBR3, BT474, célula Calu 3, MDA-MB453, MDA-MB-361 ou SKOV3. Vários métodos estão disponíveis para avaliação dos eventos celulares associados à apoptose. Por exemplo, translocação de fosfatidil serina (PS) pode ser medida através de ligação de anexina; fragmentação de DNA pode ser avaliada através de *laddering* de DNA, conforme descrito no exemplo aqui; e condensação nuclear/cromatina junto com fragmentação de DNA pode ser avaliada através de qualquer aumento nas células hipodiploides. De preferência, a proteína que induz à apoptose é uma a qual resulta em indução de cerca de 2 a 50 vezes, de preferência cerca de 5 a 50 vezes e, mais preferivelmente, cerca de 10 a 50 vezes da ligação de anexina com relação à célula.

la não-tratada em um ensaio de ligação de anexina usando células que expressam o antígeno ao qual a proteína da invenção se liga.

O termo "quantidade terapeuticamente eficaz" se refere a uma quantidade de um fármaco eficaz para tratar uma doença ou distúrbio em um mamífero. No caso de câncer, a quantidade terapeuticamente eficaz do fármaco pode reduzir o número de células cancerígenas; reduzir o tamanho do tumor; inibir (isto é, diminuir até algum ponto e, de preferência, parar) a infiltração de células cancerígenas em órgãos periféricos; inibir (isto é, diminuir até algum ponto e, de preferência, parar) a metástase tumoral; inibir, até algum ponto, o crescimento de tumor; e/ou aliviar, até algum ponto, um ou mais dos sintomas associados ao distúrbio. Até o ponto em que o fármaco pode prevenir o crescimento e/ou morte existente em células cancerígenas, ele pode ser citostático e/ou citotóxico. Para terapia de câncer, a eficácia *in vivo* pode, por exemplo, ser medida avaliando o tempo para progressão da doença (TTP) e/ou determinando as taxas de resposta (RR).

Visão Geral

Foram inventadas novas proteínas que se ligam ao IGF-IR com propriedades vantajosas incluindo, mas não limitado a: modos de ligação monovalente ou multivalente (por exemplo, um ou mais de um domínio que se liga a um alvo em particular (incluindo IGF-IR e outros receptores de tirosina quinase)); alta seletividade pelo alvo desejado com relação a outros receptores, particularmente com relação à proteínas que se ligam ao IGF-IR seletivamente com relação ao receptor de insulina; afinidade sintonizável, incluindo uma faixa de cerca de 100 nM a menos de cerca de 10 pM (incluindo afinidade fentomolar); atividade antagonista específica, ao mesmo tempo em que têm atividade agonista mínima ou indetectável; bloqueio de ligação ou ativação de IGF-I ou IGF-II; ligação monoespecífica ou multiespecífica aos alvos desejados; ligação a um único ou múltiplos epítomos; meia-vida prolongada no soro em ratos; dosagem subcutânea (SC) ou intravenosa (IV) (por exemplo, ~5 kDa a ~40 kDa); T_m's acima de cerca de 55 °C ou acima de cerca de 60 °C; e natureza substancialmente monomérica (por exemplo, único pico quando de cromatografia por exclusão de tamanho (SEC), tal co-

mo cerca de 90% da área, cerca de 95% da área ou cerca de 98% da área).

Fabricação e Testagem de Novas Proteínas em Trilhões

Como um aspecto da invenção, estima-se que 1-5 trilhões de diferentes variantes de proteína foram feitas, junto com 1-5 trilhões de variantes de RNA e DNA correspondendo a tais proteínas e que codificam tais proteínas. As proteínas que foram feitas foram testadas com relação à ligação ao IGF-IR humano e, em alguns casos, foram ainda expressas e purificadas e submetidas a uma variedade de ensaios biológicos, bioquímicos e biofísicos e medições para auxiliar na identificação de proteínas úteis adequadas, particularmente produtos terapêuticos.

Além disso, mais de 5000 variantes de proteína foram expressas em *E. coli* usando exemplos de vetores e polinucleotídeos da invenção e testadas com relação aos níveis de expressão e uma variedade de ensaios biológicos, bioquímicos e biofísicos. Dependendo dos resultados dessas medições, diferentes proteínas selecionadas foram escolhidas para fazer variações adicionalmente otimizadas com as características descritas aqui. Muitas de tais proteínas também foram testadas com relação à seletividade pelo receptor de insulina.

Os inventores foram os primeiros a aplicar esse tipo de avaliação extensiva de proteína e ligação de domínio ao IGF-IR. Uma forma de fazer e testar rapidamente as proteínas da invenção para esse tipo de avaliação é a tecnologia de fusão de proteína-ácido nucleico da Adnexus Therapeutics, Inc. A presente descrição descreve o uso de tal tecnologia de marcação e expressão *in vitro*, denominada PROfusion™, que explora fusões de proteína-ácido nucleico (fusões de proteína-RNA e DNA) para identificar novos polipeptídeos com um único e múltiplos domínios e motivos de aminoácido que são importantes para ligação ao IGF-IR e outras proteínas, incluindo receptores de tirosina quinase. A tecnologia de fusão de ácido nucleico-proteína é uma tecnologia que acopla covalentemente uma proteína à sua informação genética de codificação. A tecnologia PROfusion™ foi usada para selecionar coleções de ácidos nucleicos que codificam polipeptídeos com um único domínio construídos usando uma armação baseada no domínio de

fibronectina do tipo III humana (¹⁰Fn3) ou construídos a partir dos domínios variáveis de cadeias leves de anticorpo. Os polipeptídeos expressos, denominados uma "biblioteca" de proteínas de armação, foram selecionados com relação à polipeptídeos que poderiam se ligar a um alvo com alta afinidade.

5 Foram isolados, dessa biblioteca de proteínas de armação, novos polipeptídeos com um único domínio que se ligam ao IGF-IR e que inibem as atividades biológicas do IGF-IR. Além disso, descobriu-se que muitas alças independentemente aleatórias localizadas em armações de imunoglobulina ou similares à imunoglobulina tendem a convergir para um conjunto relacionado

10 de sequências de consenso que participam na ligação ao IGF-IR. Portanto, espera-se que polipeptídeos tendo essas sequências de consenso sejam úteis como agentes de ligação ao IGF-IR mesmo quando separados do contexto de proteína no qual eles foram identificados. Vide, por exemplo, exemplos e tabelas aqui. Tais polipeptídeos podem ser usados como pequenos

15 agentes peptídicos de ligação ao IGF-IR independentes ou podem estar localizados em outras proteínas, particularmente proteínas que compartilham uma duplicação de imunoglobulina ou similar à imunoglobulina. (Para uma descrição detalhada da tecnologia de fusão de RNA-proteína e métodos de seleção de biblioteca de proteína de armação baseada em fibronectina vide

20 Szostak e outros, Patentes U.S. Nos.: 6.258.558; 6.261.804; 6.214.553; 6.281.344; 6.207.446; 6.518.018; Publicações PCT Nos. WO00/34784; WO01/64942; WO02/032925; e Roberts e Szostak, Proc Natl. Acad. Sci. 94: 12297-12302, 1997, aqui incorporados por referência).

Conforme discutido acima, a presente descrição demonstra que

25 polipeptídeos com um único domínio tendo determinadas propriedades desejáveis, tal como alta afinidade de ligação ao IGF-IR, efeitos antagonistas com relação a um ou mais dos ligantes de tal receptor e farmacocinética aprimorada, podem ser usados como agentes anticâncer eficazes. Embora seja esperado que a eficácia de tais polipeptídeos como agentes anticâncer

30 esteja relacionada ao papel de ligantes e receptores de IGF em câncer, não é intenção estar preso a qualquer mecanismo particular.

A presente descrição representa o primeiro esforço com sucesso

de usar um polipeptídeo baseado em Fn3 criado para obter um efeito terapêutico *in vitro* e *in vivo* para o IGF-IR. Muitos dos aprimoramentos e descobertas feitas na obtenção de eficácia *in vivo* serão amplamente aplicáveis a outros polipeptídeos baseados em Fn3 a esse e outros alvos e outras porções de proteína e domínios, geralmente proteínas de menos de cerca de 50 kDa ou cerca de 40 kDa. Em outras palavras, embora as propriedades de ligação de ligante de um polipeptídeo baseado em Fn3 geralmente sejam determinadas por um número relativamente pequeno de aminoácidos localizados em regiões de alça acessíveis com solvente, outras características, tais como características farmacocinéticas, dos polipeptídeos baseados em Fn3 tenderão a ser determinadas pela maioria da proteína que não está diretamente envolvida na ligação de ligante e que é conservada de proteína para proteína, a despeito da proteína alvo. Esse tem sido o caso com anticorpos, onde umas poucas alças, denominadas regiões de CDR, mediam a ligação de antígeno, enquanto outras características do comportamento de anticorpos *in vivo* são grandemente orientadas pelas regiões da estrutura conservadas e domínios constantes.

Modalidades Adicionais de Proteína

As proteínas da invenção incluem um polipeptídeo com um único domínio descrito aqui, o qual é, em geral, um polipeptídeo que se liga a um alvo, tal como IGF-IR e onde a atividade de ligação ao alvo situada dentro de um domínio estrutural, conforme diferenciado, por exemplo, de anticorpos e anticorpos com uma única cadeia, onde a atividade de ligação a antígeno é geralmente contribuída por um domínio variável de cadeia pesada e um domínio variável de cadeia leve. A descrição também proporciona proteínas maiores que podem compreender polipeptídeos com um único domínio que se ligam ao alvo. Por exemplo, uma pluralidade de polipeptídeos com um único domínio pode ser conectada para criar uma molécula composta com avidéz aumentada ou multivalência. Da mesma forma, um polipeptídeo com um único domínio pode ser preso (por exemplo, como uma proteína de fusão) a qualquer número de outros polipeptídeos. Em determinados aspectos, um polipeptídeo com um único domínio pode compreender pelo menos cinco

a sete fitas beta ou beta-similares distribuídas entre pelo menos duas beta folhas, conforme exemplificado pelos domínios de imunoglobulina e similares à imunoglobulina. Uma fita beta-similar é um trecho de aminoácidos que participa na estabilização de um polipeptídeo com um único domínio, mas não adota necessariamente uma conformação em beta folha. Se uma fita beta-similar participa na estabilização da proteína pode ser avaliada deletando o trecho ou alterando a sequência do trecho e analisando se a estabilidade da proteína é diminuída. A estabilidade pode ser avaliada, por exemplo, através de estudos de desnaturação e renaturação térmica. De preferência, um polipeptídeo com um único domínio incluirá não mais do que duas fitas beta-similares. Uma fita beta-similar usualmente não adotará uma conformação alfa-helicoidal, mas pode adotar uma estrutura em espiral aleatória. No contexto de um domínio de imunoglobulina ou domínio similar à imunoglobulina, uma fita beta-similar ocorrerá, mais frequentemente, na posição na estrutura que, de outro modo, seria ocupada pela beta fita N-terminal ou a beta fita mais C-terminal. Um trecho de aminoácido o qual, se localizado no interior de uma sequência de proteína, normalmente formaria uma beta fita pode, quando situado em uma posição mais próxima de um N- ou C-término, adotar uma conformação que não é claramente uma beta fita e é referida aqui como uma fita beta-similar.

Em determinadas modalidades, a descrição proporciona polipeptídeos com um único domínio que se ligam ao IGF-IR. De preferência, os polipeptídeos com um único domínio se ligam ao IGF-IR humano e um IGF-IR modelo. Um polipeptídeo com um único domínio pode compreender entre cerca de 80 e cerca de 150 aminoácidos que têm uma organização estrutural compreendendo: pelo menos sete beta fitas ou fitas beta-similares distribuídas entre pelo menos duas beta folhas e pelo menos uma porção de alça que conecta duas betas fitas ou fitas beta-similares, porção de alça a qual participa na ligação ao IGF-IR. Em outras palavras, uma porção de alça pode ligar duas beta fitas, duas fitas beta-similares ou uma beta fita e uma fita beta-similar. Tipicamente, uma ou mais das porções de alça participarão na ligação ao IGF-IR, embora seja possível que uma ou mais porções de beta

fita ou fita beta-similar também participem na ligação ao IGF-IR, particularmente aquelas porções de beta fita ou fita beta-similar que estão situadas mais próximas das porções de alça. Um polipeptídeo com um único domínio pode compreender uma unidade estrutural que é um domínio de imunoglobulina ou um domínio similar à imunoglobulina. Um polipeptídeo com um único domínio pode se ligar a qualquer parte do IGF-IR, embora polipeptídeos que se ligam a um domínio extracelular de um IGF-IR sejam preferidos. A ligação pode ser avaliada em termos de constantes de equilíbrio (por exemplo, dissociação, K_D) e em termos de constantes cinéticas (por exemplo, a constante de taxa de ativação, k_{on} e a constante de taxa de desativação, k_{off}). Um polipeptídeo com um ser, tipicamente, selecionado para se ligar ao IGF-IR com uma K_D de menos de cerca de 10^{-6} M ou menos do que cerca de 10^{-7} M, cerca de 5×10^{-8} M, cerca de 10^{-8} M ou menos do que cerca de 10^{-9} M. Polipeptídeos que se ligam ao IGF-IR podem competir pela ligação com um ou mais membros da família IGF, particularmente IGF-I e IGF-II, e podem inibir um ou mais eventos biológicos mediados pelo IGF-IR, tal como proliferação de células cancerígenas e metástase cancerígena. Polipeptídeos que se ligam ao IGF-IR podem ser usados para fins terapêuticos, bem como para qualquer finalidade envolvendo a detecção ou ligação de IGF-IR.

Polipeptídeos para uso terapêutico geralmente terão uma K_D de menos de 5×10^{-8} M, menos de 10^{-8} M ou menos de 10^{-9} M, embora valores maiores de K_D possam ser tolerados, onde a k_{off} é suficientemente baixa ou onde a k_{on} é suficientemente alta. Em determinadas modalidades, um polipeptídeo com um único domínio que se liga ao IGF-IR compreenderá uma sequência de consenso ou uma ou mais das sequências de ligação ao IGF-IR selecionadas dos clones de ligação ao IGF-IR descritos aqui. De preferência, tal sequência estará situada em uma alça, particularmente as alças BC, DE e FG, conforme descrito na Publicação PCT No. WO2005/056764A2 por Chen e outros.

Em determinadas modalidades, o polipeptídeo com um único domínio compreende um domínio variável de imunoglobulina (Ig). O domínio variável de Ig pode, por exemplo, ser selecionado do grupo consistindo em:

um domínio V_L humano, um domínio V_H humano e um domínio V_{HH} de camélédeo. Uma, duas, três ou mais alças do domínio variável de Ig podem participar na ligação ao IGF-IR e, tipicamente, qualquer uma das alças conhecidas como CDR1, CDR2 ou CDR3 participará na ligação ao IGF-IR.

5 Em determinadas modalidades, o polipeptídeo com um único domínio compreende um domínio similar à imunoglobulina. Uma, duas, três ou mais alças do domínio similar à imunoglobulina podem participar na ligação ao IGF-IR. Um domínio similar à imunoglobulina preferido é um domínio de fibronectina do tipo III (Fn3). Tal domínio pode compreender, na ordem do

10 N-término para o C-término, uma beta fita ou fita beta-similar, A; uma alça AB; uma beta fita ou fita beta-similar, B; uma alça, BC; uma fita beta ou fita beta-similar, C; uma alça CD; uma beta fita ou fita beta-similar, D; uma alça DE; uma beta fita ou fita beta-similar, E; uma alça, EF; uma beta fita ou fita beta-similar, F; uma alça, FG; e uma beta fita ou fita beta-similar, G. Vide

15 Figura 24 para um exemplo da organização estrutural. opcionalmente, qualquer uma ou todas as alças AB, BC, CD, DE, EF e FG podem participar na ligação ao IGF-IR, embora alças preferidos sejam BC, DE e FG e, em particular, as alças BC e FG. Um domínio Fn3 preferido é um domínio Fn3 derivado de fibronectina humana, particularmente o 10º domínio Fn3 de fibro-

20 nectina, referido como $^{10}\text{Fn3}$. Deve ser notado que nenhum dos polipeptídeos de ligação ao IGF-IR descritos aqui tem uma sequência de aminoácido que é idêntica ao $^{10}\text{Fn3}$ nativo; a sequência foi modificada para obter proteínas de ligação ao IGF-IR, mas proteínas tendo as características estruturais básicas do $^{10}\text{Fn3}$ e, particularmente, aquelas que retêm homologia de se-

25 quência reconhecível ao $^{10}\text{Fn3}$ nativo são, todavia, referidas aqui como "polipeptídeos de Fn3". Essa nomenclatura é similar àquela encontrada no campo de anticorpo onde, por exemplo, um domínio VL de anticorpo recombinante gerado contra uma proteína alvo em particular pode não ser idêntico a qualquer domínio VL que ocorre naturalmente mas, todavia, a proteína é

30 reconhecível por uma proteína VL. Um polipeptídeo de $^{10}\text{Fn3}$ pode ser pelo menos 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85% ou 90% idêntico ao domínio $^{10}\text{Fn3}$ humano, mostrado em SEQ ID NO: 1. A maior variabilidade geralmente o-

correrá em uma ou mais das alças. Cada uma das beta fitas ou fitas beta-similares de um polipeptídeo de Fn3 consiste essencialmente de uma sequência de aminoácido que é pelo menos 80%, 85%, 90%, 95% ou 100% idêntica à sequência de uma beta fita ou fita beta-similar correspondente de

5 SEQ ID NO: 1, contanto que tal variação não rompa a estabilidade do polipeptídeo em condições fisiológicas. Um polipeptídeo de ¹⁰Fn3 pode ter uma sequência, em cada uma das alças AB, CD e EF que consiste essencialmente de uma sequência de aminoácido que é pelo menos 80%, 85%, 90%, 95% ou 100% idêntica à sequência de uma alça correspondente de SEQ ID

10 NO: 1. Em muitos casos, qualquer uma ou todas as alças BC, DE e FG será pobremente conservado com relação à SEQ ID NO: 1. Por exemplo, todas as alças BC, DE e FG podem ser menos de 20%, 10% ou 0% idênticos a suas alças correspondentes em SEQ ID NO: 1. Em algumas modalidades, apenas as alças BC e FG serão pobremente conservados com relação à

15 SEQ ID NO: 1.

Em determinadas modalidades, a descrição proporciona polipeptídeos compreendendo um décimo domínio de fibronectina do tipo III (¹⁰Fn3), em que o domínio ¹⁰Fn3 compreende uma alça, AB; uma alça, BC; uma alça, CD; uma alça, DE; uma alça EF; e uma alça FG; e tem pelo menos uma alça

20 selecionada das alças BC, DE e FG com uma sequência de aminoácido alterada com relação à sequência da alça correspondente do domínio ¹⁰Fn3 humano. Por "I" entenda-se uma ou mais alterações de sequência de aminoácido com relação a uma sequência padrão (correspondendo ao domínio de fibronectina humana) e inclui adições, deleções e substituições de aminoácido.

25 Alteração de uma sequência de aminoácido pode ser realizada através de variação de sequência intencional, às cegas ou espontânea, geralmente de uma sequência de codificação de ácido nucleico e pode ocorrer através de qualquer técnica, por exemplo, PCR, PCR propensa a erro ou síntese química de DNA.

30 Em algumas modalidades, uma ou mais alças selecionadas de BC, DE e FG podem ter o comprimento estendido ou encurtado com relação à alça de fibronectina humana correspondente. Em algumas modalidades, o

comprimento da alça pode ser estendido em 2-25 aminoácidos. Em algumas modalidades, o comprimento da alça pode ser diminuído em 1-11 aminoácidos. Em particular, a alça FG de $^{10}\text{Fn3}$ tem 12 resíduos de comprimento, enquanto que a alça correspondente nas cadeias pesadas de anticorpo oscila de 4-28 resíduos. Para otimizar a ligação a antígeno, portanto, o comprimento da alça FG do $^{10}\text{Fn3}$ tem, de preferência, o comprimento aleatório, bem como uma sequência, para abranger a faixa de CDR3 de 4-28 resíduos a fim de obter a maior flexibilidade e afinidade possíveis na ligação a antígeno. Em algumas modalidades, o motivo de ligação à integrina pode ser substituído por uma sequência de aminoácido compreendendo um aminoácido polar-aminoácido neutroaminoácido ácido (na direção N-terminal para C-terminal).

Em algumas modalidades, o polipeptídeo compreendendo um domínio $^{10}\text{Fn3}$ compreende a sequência de aminoácido de qualquer uma de SEQ ID NOs: 2-125 ou 184-202. Sequências adicionais podem ser adicionadas ao N- ou C-término. Por exemplo, uma sequência MG adicional pode ser colocada no N-término. O M usualmente será clivado, deixando uma sequência GVS... no N-término. Em algumas modalidades, sequências ligantes podem ser colocadas no C-término do domínio $^{10}\text{Fn3}$, por exemplo, SEQ ID NOs: 203 e 226.

Em determinadas modalidades, a descrição proporciona um polipeptídeo de não-anticorpo compreendendo um domínio tendo uma duplicação similar à imunoglobulina que se liga ao IGF-IR. O polipeptídeo de não-anticorpo pode ter um peso molecular de menos de 20 kDa ou menos de 15 kDa e, geralmente, será derivado (por exemplo, alteração da sequência de aminoácido) de uma proteína de referência ou "armação", tal como uma armação de Fn3. O polipeptídeo de não-anticorpo pode se ligar ao IGF-IR com uma K_D de menos de 10^{-6} M ou menos de 10^{-7} M, menos de 5×10^{-8} M, menos de 10^{-8} M ou menos de 10^{-9} M. A proteína de referência inalterada não se ligará ao IGF-IR significativamente ou se ligará com uma K_D de mais de 10^{-9} M. O polipeptídeo de não-anticorpo pode inibir a sinalização ao IGF-IR, particularmente onde o polipeptídeo de não-anticorpo tem uma K_D de menos

de 5×10^{-8} M, menos de 10^{-8} M ou menos de 10^{-9} M, embora valores maiores de K_D possam ser tolerados onde a k_{off} é suficientemente baixa (por exemplo, menos de $5 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$). A duplicação similar à imunoglobulina pode ser um polipeptídeo de $^{10}\text{Fn3}$.

5 Em determinadas modalidades, a descrição proporciona um polipeptídeo compreendendo um único domínio tendo uma duplicação de imunoglobulina que se liga ao IGF-IR. O polipeptídeo pode ter um peso molecular de menos de 20 kDa ou menos de 15 kDa e, geralmente, será derivado (por exemplo, através de alteração da sequência de aminoácido) de um domínio variável de uma imunoglobulina. O polipeptídeo pode se ligar ao IGF-IR com uma K_D de menos de 1×10^{-6} M, menos de 1×10^{-7} M, menos de 5×10^{-8} M, menos de 1×10^{-8} M ou menos de 1×10^{-9} M. O polipeptídeo pode inibir a sinalização ao IGF-IR, particularmente onde o polipeptídeo tem uma K_D de menos de 5×10^{-8} M, menos de 10^{-8} M ou menos de 10^{-9} M, embora valores maiores de K_D possam ser tolerados onde a k_{off} é suficientemente baixa ou onde a k_{on} é suficientemente alta. Em determinadas modalidades, um polipeptídeo com um único domínio pode compreender uma sequência de aminoácido selecionada dos clones de ligação ao IGF-IR descritos aqui.

20 Em determinadas modalidades, a descrição proporciona polipeptídeos de ligação ao IGF-IR compreendendo a sequência de aminoácido de qualquer um dos clones de ligação ao IGF-IR descritos aqui com a maioria das características bioquímicas desejáveis. No caso de um polipeptídeo compreendendo tais sequências de aminoácido, uma porção de PEG ou outra porção de interesse pode ser covalentemente ligada à cisteína na posição de cerca de 85 a 100, dependendo da proteína.

25 A porção de PEG pode também ser covalentemente ligada a uma porção de amina no polipeptídeo. A porção de amina pode ser, por exemplo, uma amina primeira encontrada no N-término de um polipeptídeo ou um grupo amina presente em um aminoácido, tal como lisina ou arginina.

30 Em determinadas modalidades, a porção de PEG é presa, em uma posição sobre o polipeptídeo, selecionada do grupo consistindo em: a) o N-término; b) entre o N-término e a beta fita ou fita beta-similar mais N-terminal; c) uma

alça posicionado sobre uma face do polipeptídeo oposta ao sítio de ligação do alvo; d) entre o C-término e a beta fita ou fita beta-similar mais C-terminal; e e) no C-término.

Em determinados aspectos, a descrição proporciona sequências peptídicas curtas que mediam a ligação ao IGF-IR. Tais sequências podem mediar a ligação ao IGF-IR em uma forma isolada ou quando inseridas em uma estrutura de proteína em particular, tal como um domínio de imunoglobulina ou similar à imunoglobulina. Exemplos de tais sequências incluem aquelas descritas conforme nas tabelas e outras sequências que são pelo menos 85%, 90% ou 95% idênticas à SEQ ID NO: 1 ou qualquer outra sequência listada aqui e que retém a atividade de ligação ao IGF-IR. Consequentemente, a descrição proporciona polipeptídeos substancialmente puros ou isolados compreendendo uma sequência de aminoácido que é pelo menos 85% idêntica à sequência de qualquer uma de tais sequências, em que o referido polipeptídeo se liga a um IGF-IR e compete com uma espécie IGF pela ligação ao IGF-IR. Exemplos de tais polipeptídeos incluem um polipeptídeo compreendendo uma sequência de aminoácido que é pelo menos 80%, 85%, 90%, 95% ou 100% idêntica a uma sequência de aminoácido pelo menos 85% idêntica à sequência de qualquer uma nas tabelas. De preferência, tais polipeptídeos inibirão uma atividade biológica de um IGF e podem se ligar ao IGF-IR com uma K_D de menos de 1×10^{-6} M, menos de 1×10^{-7} M, menos de 5×10^{-8} M, menos de 1×10^{-8} M ou menos de 1×10^{-9} M.

Em determinadas modalidades, qualquer um dos polipeptídeos de ligação ao IGF-IR descritos aqui pode ser ligado a uma ou mais porções adicionais incluindo, por exemplo, uma porção que também se liga ao IGF-IR (por exemplo, um segundo polipeptídeo de ligação ao IGF-IR diferente ou idêntico), uma porção que se liga a um alvo diferente (por exemplo, para criar um agente de ligação com especificidade dupla), uma porção de rotulação, uma porção que facilita a purificação de proteína ou uma porção que proporciona farmacocinética aprimorada. Farmacocinética aprimorada pode ser avaliada de acordo com a necessidade terapêutica percebida. Frequentemente, é desejável aumentar a biodisponibilidade e/ou aumentar o tempo

entre as doses, possivelmente aumentando o tempo em que uma proteína permanece disponível no soro após dosagem. Em alguns casos, é desejável melhorar a continuidade da concentração no soro da proteína com o tempo (por exemplo, diminuir a diferença na concentração no soro da proteína exatamente após administração e exatamente antes da próxima administração). Porções que tendem à eliminação lenta de uma proteína do sangue, referidas aqui como "porções PK", incluem porções de polioxialquileno, por exemplo, polietileno glicol, açúcares (por exemplo, ácido siálico) e porções de proteína bem toleradas (por exemplo, Fc, fragmentos Fc ou albumina de soro). Os polipeptídeos da invenção podem ser fundidos à albumina ou um fragmento (porção) ou variante de albumina, conforme descrito na Publicação U.S. No. 20070048282. O polipeptídeo com único domínio pode ser preso a uma porção que reduz a taxa de eliminação do polipeptídeo em um mamífero (por exemplo, camundongo, rato ou ser humano) em mais de três vezes com relação ao polipeptídeo não-modificado. Outras medidas de farmacocinética aprimorada podem incluir meia-vida no soro, a qual é frequentemente dividida em uma fase alfa e uma fase beta. Uma ou ambas as fases podem ser melhoradas significativamente através da adição de uma porção apropriada. Onde polietileno glicol é empregado, uma ou mais moléculas de PEG podem ser presas em diferentes posições na proteína e tal fixação pode ser obtida através de reação com aminas, tióis ou outros grupos reativos adequados. Peguilação pode ser obtida através de peguilação sítio-dirigida, em que um grupo reativo adequado é introduzido na proteína para criar um sítio onde peguilação ocorre preferencialmente. Em uma modalidade preferida. A proteína é modificada de modo a ter um resíduo de cisteína em uma posição desejada, permitindo peguilação sítio-dirigida sobre a cisteína. PEG pode variar amplamente quanto ao peso molecular e pode ser ramificado ou linear. Notavelmente, a presente descrição estabelece que peguilação é compatível com a atividade de ligação ao alvo de polipeptídeos de $^{10}\text{Fn3}$ e, ainda, que a peguilação melhora a farmacocinética de tais polipeptídeos. Consequentemente, em uma modalidade, a descrição proporciona formas peguiladas de polipeptídeos de $^{10}\text{Fn3}$, a despeito do alvo que pode ser liga-

do por tais polipeptídeos.

Em algumas modalidades, o polipeptídeo da invenção compreende um conjugado de uma proteína de armação baseada em fibronectina e uma porção PK. A proteína de armação baseada em fibronectina pode se ligar a qualquer proteína humana e é, de preferência, derivada de um domínio Fn3. A porção PK pode ser qualquer porção que aprimora a farmacocinética da proteína de armação baseada em fibronectina. Em algumas modalidades, a porção PK pelo menos duplica a meia-vida no soro da proteína de armação. Em algumas modalidades, a porção PK é ligada a uma proteína de armação via um ligante polipeptídico. Ligantes polipeptídicos exemplificativos incluem PSTSTST (SEQ ID NO: 244), EIDKPSQ (SEQ ID NO: 245), e os ligantes GS, tal como GSGSGSGSGS (SEQ ID NO: 246) e multímeros dos mesmos. Em algumas modalidades, a porção PK é albumina de soro humano. Em algumas modalidades, a porção PK é transferrina.

Em determinados aspectos, a descrição proporciona métodos para uso de uma proteína de ligação ao IGF-IR para inibir a atividade biológica de IGF-IR em uma célula ou inibir uma atividade biológica mediada pelo IGF-IR. A célula pode estar localizada *in vivo* ou *ex vivo* e pode ser, por exemplo, uma célula de um organismo vivo, uma célula cultivada ou uma célula em uma amostra tecidual. O método pode compreender contato da referida célula com qualquer um dos polipeptídeos de inibição de IGF-IR descritos aqui, em uma quantidade e durante um tempo suficientes para inibir tal atividade biológica.

Em determinados aspectos, a descrição proporciona métodos para tratamento de um indivíduo tendo uma condição a qual responde à inibição de IGF ou IGF-IR. Tal método pode compreender administração, ao referido indivíduo, de uma quantidade eficaz de qualquer um dos polipeptídeos de inibição de IGF-IR descritos aqui. Uma condição pode ser uma que é caracterizada por biologia inapropriada de IGF-IR. Qualquer um dos polipeptídeos de inibição de IGF-IR descritos aqui pode ser usado para o preparo de um medicamento para o tratamento de um distúrbio, particularmente um distúrbio selecionado do grupo consistindo em: um distúrbio autoimune,

uma restenose e um câncer.

Em determinados aspectos, a descrição proporciona métodos para detecção de IGF-IR em uma amostra. Um método pode compreender contato da amostra com um polipeptídeo de ligação ao IGF-IR descrito aqui, em que o referido contato é realizado sob condições que permitem formação do complexo de polipeptídeo-IGF-IR; e detecção do referido complexo, desse modo, detectando o referido IGF-IR na referida amostra. Detecção pode ser realizada usando qualquer método conhecido na técnica tal como, por exemplo, radiografia, ensaio imunológico, detecção por fluorescência, espectroscopia de massa ou ressonância de plasmônio em superfície. A amostra será, frequentemente, uma amostra biológica, tal como uma biópsia e, particularmente, uma biópsia de um tumor, um tumor suspeito. A amostra pode ser de um ser humano ou outro mamífero. O polipeptídeo de ligação ao IGF-IR pode ser rotulado com uma porção de rotulação, tal como uma porção radioativa, uma porção fluorescente, uma porção cromogênica, uma porção quimioluminescente ou uma porção de hapteno. O polipeptídeo de ligação ao IGF-IR pode ser imobilizado sobre um suporte sólido.

Outro aspecto da descrição se refere a um ácido nucleico compreendendo uma sequência de ácido nucleico que codifica um polipeptídeo descrito aqui. Em determinadas modalidades, um ácido nucleico pode compreender uma sequência de ácido nucleico que codifica um polipeptídeo selecionado do grupo consistindo em qualquer uma das sequências de proteína nas tabelas descritas aqui.

Um outro aspecto da descrição se refere a um vetor de expressão compreendendo um ácido nucleico operavelmente ligado a um promotor, em que o ácido nucleico codifica um polipeptídeo descrito aqui. Outro aspecto da descrição se refere a uma célula compreendendo um ácido nucleico descrito aqui. Também proporcionado é um método de produção do polipeptídeo que se liga ao IGF-IR compreendendo: expressão de um ácido nucleico que codifica um polipeptídeo da descrição. Em determinadas modalidades, o ácido nucleico pode compreender uma sequência que codifica um polipeptídeo selecionado do grupo consistindo em qualquer uma das se-

quências nas tabelas descritas aqui e suas proteínas correspondentes. Em determinadas modalidades, o ácido nucleico é expresso em uma célula. Alternativamente, o ácido nucleico é expresso em um sistema isento de células.

5 Em determinados aspectos, a descrição proporciona descobertas que podem ser aplicáveis a qualquer polipeptídeo de $^{10}\text{Fn3}$, a despeito de qual alvo o polipeptídeo é manipulado para se ligar. Conforme notado acima, a descrição demonstra que PEG pode ser usado com sucesso para
10 melhorar a farmacocinética de um polipeptídeo de $^{10}\text{Fn3}$, ao mesmo tempo em que não interfere significativamente com a ligação ao alvo. Consequentemente, a descrição proporciona polipeptídeos de $^{10}\text{Fn3}$ peguilados que se ligam ao alvo e têm farmacocinética aperfeiçoada c recipiente ao polipeptídeo não-peguilado. Em uma outra modalidade, a descrição demonstra que uma deleção dos primeiros oito aminoácidos de um polipeptídeo de $^{10}\text{Fn3}$
15 pode aumentar a afinidade de ligação pelo alvo. Consequentemente, a descrição proporciona polipeptídeos de $^{10}\text{Fn3}$ carecendo dos oito aminoácidos iniciais (aminoácidos numerados em referência à sequência de SEQ ID NO: 1). Deve ser entendido que um ou mais aminoácidos podem ser adicionados à forma deletada do polipeptídeo de modo a facilitar a tradução e processa-
20 mento apropriados. A descrição demonstra que administração subcutânea de um polipeptídeo de $^{10}\text{Fn3}$ resulta em uma liberação retardada de polipeptídeo na corrente sanguínea e uma concentração máxima diminuída no soro do polipeptídeo de Fn3 . Consequentemente, a descrição proporciona métodos para administração de um polipeptídeo de $^{10}\text{Fn3}$ a um paciente através
25 de administração subcutânea. Essa via de administração pode ser útil para obter uma liberação retardada com relação à administração intravenosa e/ou diminuir a concentração máxima no soro do polipeptídeo de $^{10}\text{Fn3}$ em pelo menos 25% ou pelo menos 50% com relação à concentração máxima no soro obtida através de administração intravenosa de uma dosagem igual. O
30 polipeptídeo de $^{10}\text{Fn3}$ administrado pode ser preso a uma porção que aumenta a meia-vida no soro (ou diminui a taxa de eliminação ou afeta similarmente outros parâmetros farmacocinéticos) do polipeptídeo de $^{10}\text{Fn3}$, tal

como uma porção de polietileno glicol. De preferência, o polipeptídeo de $^{10}\text{Fn3}$ administrado compreende uma sequência de aminoácido que é pelo menos 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90% idêntica à SEQ ID NO: 1.

Em determinados aspectos, a descrição proporciona polipeptídeos com um único domínio que se ligam a uma proteína alvo pré-selecionada de um primeiro mamífero e um homólogo da mesma a partir de um segundo mamífero. Tais polipeptídeos com um único domínio são particularmente úteis onde o primeiro mamífero é um ser humano e o segundo mamífero é um mamífero desejável no qual conduzir testagem pré-clínica, tal como um camundongo, rato, porco-da-índia, cão ou primata não-humano. A descrição demonstra que polipeptídeos com um único domínio podem ser manipulados para ter tal especificidade dupla e que a especificidade dupla simplifica o desenvolvimento de fármaco permitindo testagem do mesmo polipeptídeo em células humanas, seres humanos e modelos animais. De preferência, a proteína alvo pré-selecionada do primeiro mamífero e o homólogo da mesma do segundo mamífero são suficientemente similares, quanto à sequência de aminoácido, para permitir geração de polipeptídeos com especificidade dupla. Por exemplo, a proteína alvo pré-selecionada e o homólogo do segundo mamífero podem compartilhar pelo menos 80%, 90% ou 95% de identidade através de uma região de pelo menos 50 aminoácidos e, opcionalmente, podem compartilhar pelo menos 80%, 90% ou 95% de identidade através da sequência de proteína toda ou através de da sequência do domínio extracelular, no caso de uma proteína da membrana. Um polipeptídeo com único domínio desse tipo de característica de ligação com especificidade dupla pode compreender um domínio de imunoglobulina ou similar à imunoglobulina e, de preferência, se ligará à proteína alvo humana pré-selecionada e ao homólogo da mesma com uma constante de dissociação de menos de $1 \times 10^{-6} \text{ M}$, $1 \times 10^{-7} \text{ M}$, $5 \times 10^{-8} \text{ M}$, $1 \times 10^{-8} \text{ M}$ ou $1 \times 10^{-9} \text{ M}$.

Ensaio adicionais

Inibição de IGF-IR via níveis de IGF-IR em fosforilação de tirosina ou crescimento de tumor in vivo através de proteínas de ligação ao IGF-IR da invenção

Em outra modalidade, a administração de ligante de IGF-IR a um animal causa uma redução nos níveis de IGF-IR em tumores expressando IGF-IR. Em uma modalidade preferida, o ligante de IGF-IR causa uma redução nos níveis de receptor em pelo menos 20%, comparado com um animal não-tratado. Em uma modalidade mais preferida, o ligante de IGF-IR causa uma redução no sinal de fosfotirosina de pelo menos 20%. Em uma modalidade mais preferida, o ligante de IGF-IR causa uma diminuição no sinal de fosfotirosina de pelo menos 50%, mais preferivelmente 60%. Em uma modalidade ainda mais preferida, o ligante causa uma diminuição no sinal de fosfotirosina de pelo menos 70%, mais preferivelmente 80%, ainda mais preferivelmente 90%.

Em outra modalidade, a administração de ligação de IGF-IR a um animal causa uma redução nos níveis de IGF-IR em tumores expressando IGF-IR. Em uma modalidade preferida, o ligante de IGF-IR causa uma redução nos níveis de receptor de pelo menos 20% comparado com um animal não-tratado. Em uma modalidade mais preferida, o ligante de IGF-IR causa uma diminuição nos níveis de receptor de pelo menos 50%, mais preferivelmente 60% dos níveis de receptor em um animal não-tratado. Em uma modalidade ainda mais preferida, o ligante causa uma diminuição nos níveis de receptor de pelo menos 70%, mais preferivelmente 80%.

Modulação in vivo

Em outra modalidade de uma proteína da invenção, um ligante de IGF-IR inibe o crescimento de células tumorais *in vivo*. A célula tumoral pode ser derivada de qualquer tipo de célula incluindo, sem limitação, células epidérmicas, epiteliais, endoteliais, de leucemia, sarcoma, mieloma múltiplo ou mesodérmicas. Exemplos de linhagens de célula tumoral comuns para uso em estudos de xenoenxerto de tumor incluem células A549 (carcinoma de pulmão de células não pequenas), células DU-145 (próstata), células MCF-7 (mama), células Colo 205 (cólon), células 3T3/IGF-IR (fibroblasto de camundongo), células NCIH441, células HEP G2 (hepatoma), células MDA MB 231 (mama), células HT-29 (cólon), células MDA-MB-435s (mama), células U266, células SH-SY5Y, células Sk-Mel-2, células NCI-H929,

RPM18226 e A431. Em uma modalidade preferida, o ligante inibe o crescimento de células tumorais quando comparado com o crescimento do tumor em um animal não-tratado. Em uma modalidade mais preferida, o ligante inibe o crescimento de células tumorais em 50%. Em uma modalidade ainda mais preferida, o ligante inibe o crescimento de células tumorais em 60%, 65%, 70% ou 75%. Em uma modalidade, a inibição do crescimento de células tumorais é medida pelo menos 7 dias após os animais terem iniciado o tratamento com o ligante. Em uma modalidade mais preferida, a inibição de crescimento de células tumorais é medida pelo menos 14 dias após os animais terem começado o tratamento com o ligante. Em outra modalidade preferida, outro agente antineoplásico é administrado ao animal com o ligante de IGF-IR. Em uma modalidade preferida, o agente antineoplásico é capaz de inibir adicionalmente o crescimento da célula tumoral. Em uma modalidade ainda mais preferida, o agente antineoplásico é adriamicina, taxol, tamoxifeno, 5-fluorodeóxiuridina (5-FU) ou CP-358.774.

Modalidades biespecíficas e multiespecíficas adicionais

Em muitas modalidades, será desejável fazer composições multiespecíficas, por exemplo, composições que se ligam a mais de um alvo ou outra proteína de interesse. Em um aspecto, as proteínas da invenção compreendem uma primeira proteína com uma afinidade de ligação de cerca de 10 nM (outra afinidade apropriada descrita aqui) a um primeiro alvo desejado (por exemplo, IGF-IR) ou menos e se liga a um alvo relacionado indesejado (por exemplo, receptor de insulina humano) com uma afinidade de ligação de cerca de 1 μ M (outra afinidade de ligação apropriada descrita aqui) ou maior e ligação com relação ao alvo desejado (por exemplo, IGF-IR) e tem, de preferência, um único domínio ou é substancialmente monovalente e é ligada a uma segunda proteína com uma afinidade de ligação de cerca de 10 nM (outra afinidade apropriada descrita aqui) a um segundo alvo desejado (por exemplo, EGFR, c-Met, c-kit, Her2, FGFR1, VEGFR2, VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D,, receptor de folato) ou menos e se liga a um alvo relacionado indesejado (por exemplo, receptor de insulina humano) com uma afinidade de ligação de cerca de 1 μ M (outra afinidade de ligação apropriada

descrita aqui) ou maior e tem, de preferência, um único domínio ou é substancialmente monovalente. Tais modalidades com afinidade biespecífica podem ser ainda presas à outras moléculas, incluindo outras proteínas descritas aqui.

5 Em um aspecto, as proteínas da invenção compreendem o primeiro domínio ¹⁰F_n3 que se liga ao IGF-IR e um segundo domínio ¹⁰F_n3 que se liga ao VEGFR2. Polipeptídeos de ligação ao VEGFR2 foram gerados conforme descrito na Publicação PCT No. WO2005/056764, a qual é aqui incorporada por referência. Sequências dos polipeptídeos de ¹⁰F_n3 de ligação ao VEGFR-2 preferidos úteis para a invenção são mostrados na Figura 30 - SEQ ID NOs: 126-183. As proteínas da invenção incluem as sequências de aminoácido descritas com deleções dos primeiros 8 aminoácidos e podem incluir aminoácidos adicionais no N- ou C-término. Por exemplo, uma sequência MG adicional pode ser colocada no N-término. O M usualmente
10 será clivado, deixando uma sequência GEV... no N-término. A readição dos 8 aminoácidos normais no N-término também produz uma proteína de ligação ao VEGFR2 com propriedades desejadas. Em algumas modalidades, a metionina N-terminal é clivada. Para uso *in vivo*, uma forma adequada para peguilação pode ser gerada. Em uma modalidade, uma cauda C-terminal compreendendo uma cisteína pode ser adicionada (por exemplo, EIDKPCQ (SEQ ID NO: 225) é adicionada no C-término).
15 20

 Em um aspecto, as proteínas da invenção compreendem uma primeira proteína com uma afinidade de ligação de cerca de 10 nM (outra afinidade apropriada descrita aqui) ao primeiro alvo desejado (por exemplo, EGFR) ou menos e se liga a um alvo relacionado indesejado (por exemplo, receptor de insulina humano) com uma afinidade de ligação de cerca de 1 μM (outra afinidade de ligação apropriada descrita aqui) ou maior e tem, de preferência, um único domínio ou é substancialmente monovalente e é ligada a uma segunda proteína com uma afinidade de ligação de cerca de 10
25 30 nM (outra afinidade apropriada descrita aqui) a um segundo alvo desejado (por exemplo, Her2, receptor de folato) ou menos e se liga a um alvo relacionado indesejado (por exemplo, receptor de insulina humano) com uma

afinidade de ligação de cerca de 1 μ M (outra afinidade de ligação apropriada descrita aqui) ou maior e tem, de preferência, um único domínio ou é substancialmente monovalente. Tais modalidades com afinidade biespecífica podem ser ainda presas à outras moléculas, incluindo outras proteínas descritas aqui.

Em um aspecto, as proteínas da invenção compreendem uma primeira proteína com uma afinidade de ligação de cerca de 10 nM (outra afinidade apropriada descrita aqui) ao primeiro alvo desejado (por exemplo, EGFR) ou menos e se liga a um alvo relacionado indesejado (por exemplo, receptor de insulina humano) com uma afinidade de ligação de cerca de 1 μ M (outra afinidade de ligação apropriada descrita aqui) ou maior e tem, de preferência, um único domínio ou é substancialmente monovalente e é ligada a uma segunda proteína com uma afinidade de ligação de cerca de 10 nM (outra afinidade apropriada descrita aqui) a um segundo alvo desejado (por exemplo, VEGFR2) ou menos e se liga a um alvo relacionado indesejado (por exemplo, VEGFR1) com uma afinidade de ligação de cerca de 1 μ M (outra afinidade de ligação apropriada descrita aqui) ou maior e tem, de preferência, um único domínio ou é substancialmente monovalente. Tais modalidades com afinidade biespecífica podem ser ainda presas à outras moléculas, incluindo outras proteínas descritas aqui.

Em um aspecto, as proteínas da invenção compreendem uma primeira proteína com uma afinidade de ligação de cerca de 10 nM (outra afinidade apropriada descrita aqui) ao primeiro alvo desejado (por exemplo, Her2) ou menos e se liga a um alvo relacionado indesejado (por exemplo, Her4) com uma afinidade de ligação de cerca de 1 μ M (outra afinidade de ligação apropriada descrita aqui) ou maior e tem, de preferência, um único domínio ou é substancialmente monovalente e é ligada a uma segunda proteína com uma afinidade de ligação de cerca de 10 nM (outra afinidade apropriada descrita aqui) a um segundo alvo desejado (por exemplo, VEGFR2) ou menos e se liga a um alvo relacionado indesejado (por exemplo, VEGFR1) com uma afinidade de ligação de cerca de 1 μ M (outra afinidade de ligação apropriada descrita aqui) ou maior e tem, de preferência, um úni-

co domínio ou é substancialmente monovalente. Tais modalidades com afinidade biespecífica podem ser ainda presas à outras moléculas, incluindo outras proteínas descritas aqui.

Em um aspecto, as proteínas da invenção compreendem uma
5 primeira proteína com uma afinidade de ligação de cerca de 10 nM (outra afinidade apropriada descrita aqui) ao primeiro alvo desejado (por exemplo, FGFR1, c-Met, c-kit) ou menos e se liga a um alvo relacionado indesejado (por exemplo, receptor de insulina humano) com uma afinidade de ligação de cerca de 1 μ M (outra afinidade de ligação apropriada descrita aqui) ou
10 maior e tem, de preferência, um único domínio ou é substancialmente monovalente e é ligada a uma segunda proteína com uma afinidade de ligação de cerca de 10 nM (outra afinidade apropriada descrita aqui) a um segundo alvo desejado (por exemplo, VEGFR2) ou menos e se liga a um alvo relacionado indesejado (por exemplo, VEGFR1) com uma afinidade de ligação de cerca
15 de 1 μ M (outra afinidade de ligação apropriada descrita aqui) ou maior e tem, de preferência, um único domínio ou é substancialmente monovalente. Tais modalidades com afinidade biespecífica podem ser ainda presas à outras moléculas, incluindo outras proteínas descritas aqui.

Em um aspecto, as proteínas da invenção compreendem uma
20 primeira proteína com uma afinidade de ligação de cerca de 10 nM (outra afinidade apropriada descrita aqui) ao primeiro alvo desejado (por exemplo, Her2) ou menos e se liga a um alvo relacionado indesejado (por exemplo, receptor de insulina humano) com uma afinidade de ligação de cerca de 1 μ M (outra afinidade de ligação apropriada descrita aqui) ou maior e tem, de
25 preferência, um único domínio ou é substancialmente monovalente e é ligada a uma segunda proteína com uma afinidade de ligação de cerca de 10 nM (outra afinidade apropriada descrita aqui) a um segundo alvo desejado (por exemplo, Her3) ou menos e se liga a um alvo relacionado indesejado (por exemplo, Her4) com uma afinidade de ligação de cerca de 1 μ M (outra
30 afinidade de ligação apropriada descrita aqui) ou maior e tem, de preferência, um único domínio ou é substancialmente monovalente. Tais modalidades com afinidade biespecífica podem ser ainda presas à outras moléculas,

incluindo outras proteínas descritas aqui.

Modalidades de PEG adicionais

Essa é a primeira vez que PEG (ou uma molécula similarmente funcional) pode ser usado para conectar duas proteínas que são porções de não-anticorpo que se ligam a um único alvo, particularmente proteínas em que cada proteína de ligação é compreendida de um único domínio ou múltiplos domínios, usualmente em que cada domínio tem cerca de 50 ou cerca de 60 ou cerca de 75 aminoácidos ou mais (em oposição a pequenos peptídeos de 5 a 20 aminoácidos). De preferência, proteínas de armação de fibronectina podem ser usados vantajosamente em tais modalidades e, mais preferivelmente, com manipulação apropriada de aminoácidos Cys ou Lys.

Essa é a primeira vez que PEG (ou uma molécula funcionalmente equivalente) pode ser usado para conectar duas proteínas que são porções de não-anticorpo que se ligam a dois ou mais alvos ou proteínas diferentes de interesse (por exemplo, uma proteína de modulação de PK), particularmente proteínas em que cada proteína de ligação é compreendida de um único domínio ou múltiplos domínios, usualmente em que cada domínio tem cerca de 50 ou cerca de 60 ou cerca de 75 aminoácidos ou mais (em oposição a pequenos peptídeos de 5 a 20 aminoácidos). De preferência, proteínas de armação de fibronectina podem ser usados vantajosamente em tais modalidades e, mais preferivelmente, com manipulação apropriada de aminoácidos Cys ou Lys.

Além disso, aspectos de PEG e não-PEG da invenção incluem porções de anticorpo (por exemplo, anticorpos de camelo e seus derivados, bem como anticorpos com uma única cadeia e domínio; e, particularmente, aqueles expressos a partir de micróbios) e porções similares a anticorpo (por exemplo, derivados de lipocalinas, anquirinas, múltiplos domínios Cys-Cys e tetranectinas; e, particularmente, aqueles expressos a partir de micróbios), particularmente aqueles de menos de cerca de 40 kDa que são conectados através de PEG e, mais particularmente, aqueles que têm um número limitado de aminoácidos cys.

Existem muitas propriedades e vantagens das proteínas PEG-

ligadas da invenção não previamente reconhecidas ou descobertas. Quando tais proteínas são expressas em micróbios, pode ser preferível isolar os domínios e, então, ligá-los via PEG ou outro ligante polimérico. PEG ou outros ligantes poliméricos operavelmente funcionais podem ser usados para variar

5 otimamente a distância entre cada porção de proteína para criar uma proteína com uma ou mais das seguintes características: 1) impedimento estérico reduzido ou aumentado de ligação de um ou mais domínios de proteína quando de ligação a uma proteína de interesse (por exemplo, um alvo), 2) conectar dois ou mais domínios que ligam diferentes alvos, 3) aumentar a

10 estabilidade ou solubilidade sem buscar substituições de aminoácido adicionais para aumentar a estabilidade ou solubilidade (por exemplo, solubilidade de pelo menos cerca de 20 mg/ml ou pelo menos cerca de 50 mg/ml), 4) diminuir a agregação de proteína sem buscar substituições de aminoácido adicionais para diminuir a estabilidade (por exemplo, conforme medido através de SEC), 4) aumentar a avidéz ou afinidade global da proteína pela proteína de interesse através da adição de domínios adicionais. Vantagens adicionais de proteínas PEG-ligadas incluem fazer rapidamente modos de ligação multivalente, monoespecífica, bem como modos de ligação multiespecífica, monovalente ou multivalente, dependendo do número de porções de

15 objetivação de proteína que são incluídos na proteína PEG-ligada.

20

Os polipeptídeos de $^{10}\text{Fn3}$ da invenção podem ser peguilados e reter atividade de ligação de ligante. Em uma modalidade preferida, o polipeptídeo de $^{10}\text{Fn3}$ peguilado é produzido através de peguilação sítio-dirigida, particularmente através de conjugação de PEG a uma porção de cisteína no

25 N- ou C-término. Consequentemente, a presente descrição proporciona um polipeptídeo de $^{10}\text{Fn3}$ de ligação a alvo com propriedades farmacocinéticas aperfeiçoadas, o polipeptídeo compreendendo: um domínio Fn3 tendo de cerca de 80 a cerca de 150 aminoácidos, em que pelo menos uma das alças do referido domínio $^{10}\text{Fn3}$ participa na ligação ao alvo; e uma porção PEG

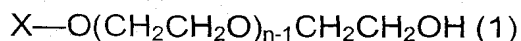
30 covalentemente ligada, em que o referido polipeptídeo de $^{10}\text{Fn3}$ se liga ao alvo com uma K_D de menos de 100 nM e tem uma taxa de eliminação de menos de 30 mL/h/kg em um mamífero. A porção PEG pode ser presa ao

polipeptídeo de $^{10}\text{Fn3}$ através de peguilação dirigida, tal como através de fixação a um resíduo de Cys, onde o resíduo de Cys pode estar posicionado no N-término do polipeptídeo de $^{10}\text{Fn3}$ ou entre o N-término e a fita beta ou fita beta-similar mais N-terminal ou no C-término do polipeptídeo de Fn3 ou entre o C-término e a beta fita ou fita beta-similar mais C-terminal. Um resí-
5 duo de Cys pode estar localizado em outras posições também, particularmente qualquer uma das alças, de modo a não participar na ligação ao alvo. Uma porção PEG também pode ser presa através de outra química, incluindo através de conjugação à aminas. Além disso, a invenção inclui esse tipo
10 de conjugação de PEG N ou C terminal à porções de anticorpo (por exemplo, anticorpos de camelo e seus derivados, bem como anticorpos com uma única cadeia e domínio; e, particularmente, aqueles expressos a partir de micróbios) e porções similares a anticorpo (por exemplo, derivados de lipocalinas, anquirinas, múltiplos domínios Cys-Cys e tetranectinas; e, particularmente, aqueles expressos a partir de micróbios), particularmente aqueles
15 de menos de cerca de 40 kDa que são conectados através de PEG e, mais particularmente, aqueles que têm um número limitado de aminoácidos cys.

Em uma modalidade específica da presente invenção, formas modificadas dos polipeptídeos solúveis em questão compreendem ligação
20 dos polipeptídeos solúveis em questão a polímeros não-proteináceos. Em uma modalidade específica, o polímero é polietileno glicol ("PEG"), polipropileno glicol ou polioxialquilenos, na maneira conforme apresentado nas Patentes U.S. Nos. 4.640.835; 4.496.689; 4.301.144; 4.670.417; 4.791.192 ou 4.179.337. Exemplos do polipeptídeo modificado da invenção incluem proteínas PEGuiladas ainda descritas aqui.
25

PEG é um polímero solúvel em água bem-conhecido que está comercialmente disponível ou pode ser preparado através de polimerização com abertura de anel de etileno glicol de acordo com métodos conhecidos na técnica (Sandier e Karo, Polymer Synthesis, Academic Press, New York,
30 Vol. 3, páginas 138-161). O termo "PEG" é usado amplamente para abranger qualquer molécula de polietileno glicol, sem considerar o tamanho ou modificação de uma extremidade do PEG e pode ser representado pela fór-

mula:



onde n é entre 20 a 2300 e X é H ou uma modificação terminal, por exemplo, uma C₁₋₄ alquila. Em uma modalidade, o PEG da invenção
 5 termina sobre uma extremidade com hidróxi ou metóxi, isto é, X é H ou CH₃ ("metóxi PEG"). Um PEG pode conter outros grupos químicos os quais são necessários para reações de ligação; os quais resultam da síntese química da molécula; ou os quais são um espaçador para distância otimizada de partes da molécula. Além disso, tal PEG pode consistir de uma ou mais cadeias
 10 laterais de PEG as quais são ligadas juntas. PEGs com mais de uma cadeia de PEG são denominados PEGs com múltiplos braços ou ramificado. PEGs ramificados podem ser preparados, por exemplo, através da adição de óxido de polietileno a vários polióis, incluindo glicerol, pentaeritritol e sorbitol. Por exemplo, um PEG ramificado com quatro braços pode ser preparado a partir
 15 de pentaeritritol e óxido de etileno. PEG ramificado é descrito, por exemplo, no Pedido de Patente Europeu Publicado No. 473084A e Patente U.S. No. 5.932.462. Uma forma de PEGs inclui duas cadeias laterais de PEG (PEG2) ligadas via os grupos amino primários de uma lisina (Monfardini, C. e outros, Bioconjugate Chem. 6 (1995) 62-69).

20 Embora PEG seja bem-conhecido, ele é, pelo que nós sabemos, a primeira demonstração de que dois polipeptídeos de Fn3 distintos podem ser peguilados e reter a atividade de ligação a ligante. Em uma modalidade preferida, o polipeptídeo de ¹⁰Fn3 peguilado é produzido através de peguilação sítio-dirigida, particularmente através de conjugação de PEG a
 25 uma porção de cisteína no N- ou C-término. Consequentemente, a presente descrição proporciona um polipeptídeo de Fn3 de ligação-alvo com propriedades farmacocinéticas aperfeiçoadas, o polipeptídeo compreendendo: um domínio ¹⁰Fn3 tendo de cerca de 80 a cerca de 150 aminoácidos, em que pelo menos uma das alças do referido domínio ¹⁰Fn3 participa na ligação ao
 30 alvo; e uma porção PEG covalentemente ligada, em que o referido polipeptídeo de ¹⁰Fn3 se liga ao alvo com uma KD de menos de 100 nM e tem uma taxa de eliminação de menos de 30 mL/h/kg em um mamífero. A porção

PEG pode ser presa ao polipeptídeo de $^{10}\text{Fn3}$ através de peguilação sítio-dirigida, tal como através de fixação a um resíduo de Cys, onde o resíduo de Cys pode estar posicionado no N-término do polipeptídeo de $^{10}\text{Fn3}$ ou entre o N-término e a fita beta ou fita beta-similar mais N-terminal ou no C-término do polipeptídeo de Fn3 ou entre o C-término e a beta fita ou fita beta-similar mais C-terminal. Um resíduo de Cys pode estar localizado em outras posições também, particularmente qualquer uma das alças, de modo a não participar na ligação ao alvo. Uma porção PEG também pode ser presa através de outra química, incluindo através de conjugação à aminas.

A conjugação de PEG a peptídeos ou proteínas geralmente envolve a ativação de PEG e acoplamento de PEG-intermediários ativados diretamente às proteínas/peptídeos alvo ou a um ligante, o qual é subsequentemente ativado e acoplado às proteínas/peptídeos alvo (vide Abuchowski, A. e outros, *J. Biol. Chem.*, 252, 3571 (1977) e *J. Biol. Chem.*, 252, 3582 (1977), Zalipsky e outros e Harris e outros em: *Poly(ethylene glycol) Chemistry: Biotechnical and Biomedical Applications*; (J. M. Harris ed.) Plenum Press: New York, 1992; Capítulos 21 e 22). Deve ser notado que um polipeptídeo de ligação contendo uma molécula de PEG é também conhecido como uma proteína conjugada, enquanto que a proteína carecendo de uma molécula de PEG presa pode ser referida como não-conjugada.

Uma variedade de formas de massa molecular de PEG podem ser selecionadas, por exemplo, de cerca de 1.000 Dáltons (Da) a 100.000 Da (n é 20 a 2300), para conjugação aos polipeptídeos de ligação da invenção. O número de unidades de repetição " n " no PEG é aproximado para a massa molecular descrita em Dáltons. É preferido que a massa molecular combinada do PEG sobre um ligante ativo seja adequada para uso farmacêutico. Assim, em uma modalidade, a massa molecular das moléculas de PEG não excedem a 100.000 Da. Por exemplo, se três moléculas de PEG são presas a um ligante, onde cada molécula de PEG tem a mesma massa molecular de 12.000 Da (cada n é cerca de 270), então, a massa molecular total do PEG sobre o ligante é cerca de 36.000 Da (total de n é cerca de 820). As massas moleculares do PEG preso ao ligante também podem ser

diferentes, por exemplo, das três moléculas sobre um ligante, duas moléculas de PEG podem ter 5.000 Da cada (cada n é cerca de 110) e uma molécula de PEG pode ter 12.000 Da (n é cerca de 270).

Em uma modalidade específica da invenção, um IGF-IR ou outro polipeptídeo de ligação a receptor é covalentemente ligado a um grupo (poli)etileno glicol da fórmula: $\text{—CO—(CH}_2\text{)}_x\text{—(OCH}_2\text{CH}_2\text{)}_n\text{—OR}$, com —CO (isto é, carbonila) do grupo polietileno glicol formando uma ligação de amida com um dos grupos amino do polipeptídeo de ligação; R sendo alquila inferior; x sendo 2 ou 3; m sendo de cerca de 450 a cerca de 950; e n e m sendo escolhidos de modo que o peso molecular do conjugado menos o polipeptídeo de ligação é de cerca de 10 a 40 kDa. Em uma modalidade, um grupo amino de um polipeptídeo de ligação de uma lisina é o grupo amino disponível (livre).

Os conjugados acima podem, mais especificamente, ser representados pela fórmula (II): $\text{P—NHCO—(CH}_2\text{)}_x\text{—(OCH}_2\text{CH}_2\text{)}_m\text{—OR}$ (II), em que P é o grupo de um polipeptídeo de ligação conforme descrito aqui (isto é, sem o grupo amino ou grupos amino os quais formam uma ligação de amida com a carbonila mostrada na fórmula (II)); e em que R é alquila inferior; x é 2 ou 3; m é de cerca de 450 a cerca de 950 e é escolhido de modo que o peso molecular do conjugado menos o polipeptídeo de ligação é de cerca de 10 a cerca de 40 kDa. Conforme usado aqui, as faixas fornecidas de "m" têm um significado de orientação. As faixas de "m" são determinadas, em qualquer caso e exatamente, pelo peso molecular do grupo PEG.

Aqueles versados na técnica podem selecionar uma massa molecular adequada para o PEG, por exemplo, baseado em como o polipeptídeo de ligação peguilado será usado terapeuticamente, a dosagem desejada, tempo de circulação, resistência à proteólise, imunogenicidade e outras considerações. Para uma discussão de PEG e seu uso para intensificar as propriedades de proteínas vide N. V. Katre, *Advanced Drug Delivery Reviews* 10: 91-114(1993).

Em uma modalidade da invenção, moléculas de PEG podem ser ativadas para reagir com grupos amino sobre um polipeptídeo de ligação, tal

como com lisinas (Bencham C. O. e outros, *Anal. Biochem.*, 131, 25 (1983); Veronese, F. M. e outros, *Appl. Biochem.*, 11, 141 (1985); Zalipsky, S. e outros, *Polymeric Drugs and Drug Delivery Systems*, adrs 9-110 ACS Symposium Series 469 (1999); Zalipsky, S. e outros, *Europ. Polym. J.*, 19, 1177-1183 (1983); Delgado, C. e outros, *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 12, 119-128 (1990)).

Em uma modalidade específica, ésteres de carbonato de PEG são usados para formar os conjugados de polipeptídeo de ligação-PEG. Carbonato de N,N'-dissuccinimidila (DSC) pode ser usado na reação com PEG para formar carbonato de succinimidila-PEG misturado ativo que pode ser subsequentemente reagido com um ligante nucleofílico ou um grupo amino de um polipeptídeo de ligação (vide Patente U.S. No. 5.281.698 e Patente U.S. No. 5.932.462). Em um tipo similar de reação, carbonato de 1,1'-(dibenzotriazolila) e carbonato de di-(2-piridila) podem ser reagidos com PEG para formar um carbonato de PEG-benzotriazolila e PEG-piridila misturado (Patente U.S. No. 5.382.657), respectivamente.

Pegulação de um polipeptídeo de Fn3 pode ser realizada de acordo com os métodos do estado da técnica, por exemplo, através de reação do polipeptídeo de ligação com PEGs eletrofilicamente ativos (fornecedor: Shearwater Corp., EUA, www.shearwatercorp.com). Regentes de PEG preferidos da presente invenção são, por exemplo, propionatos de N-hidróxi-succinimidila (PEG-SPA), butanoatos (PEG-SBA), propionato de PEG-succinimidila ou N-hidróxi-succinimidas ramificadas, tal como mPEG2-NHS (Monfardini, C. e outros, *Bioconjugate Chem.* 6 (1995) 62-69). Tais métodos podem ser usados para pegar um grupo ϵ -amino de uma lisina de um polipeptídeo de ligação ou o grupo amino N-terminal do polipeptídeo de ligação.

Em outra modalidade, moléculas de PEG podem ser acopladas a grupos sulfidril sobre um polipeptídeo de ligação (Sartore, L., e outros, *Appl. Biochem. Biotechnol.*, 27, 45 (1991); Morpurgo e outros, *Biocon. Chem.*, 7, 363-368 (1996); Goodson e outros, *Bio/Technology* (1990) 8, 343; Patente U.S. No. 5.766.897). As Patentes U.S. Nos. 6.610.281 e 5.766.897 descrevem espécies de PEG reativo exemplificativas que podem ser acopla-

das a grupos sulfidríla.

Em algumas modalidades onde moléculas de PEG são conjugadas a resíduos de cisteína sobre um polipeptídeo de ligação, os resíduos de cisteína são nativos ao polipeptídeo de ligação enquanto que, em outras modalidades, um ou mais resíduos de cisteína são manipulados no polipeptídeo de ligação. Mutações podem ser introduzidas em uma sequência de codificação de polipeptídeo de ligação para gerar resíduos de cisteína. Isso poderia ser obtido, por exemplo, através de mutação de um ou mais resíduos de aminoácido à cisteína. Aminoácidos preferidos para mutação de um resíduo de cisteína é um resíduo exposto na superfície. Algoritmos são bem-conhecidos na técnica para previsão de acessibilidade na superfície de resíduos baseados na sequência primária de uma proteína. Alternativamente, resíduos na superfície podem ser previstos comparando as sequências de aminoácido de polipeptídeos de ligação, contanto que a construção de cristal da estrutura sobre a qual polipeptídeos de ligação são criados e desenvolvidos tenha sido resolvida (vide Himanen e outros, *Nature*. (2001) 20-27; 414(6866): 933-8) e, assim, os resíduos expostos na superfície identificados. Em uma modalidade, resíduos de cisteína são introduzidos em polipeptídeos de ligação em ou próximo do N- e/ou C-término ou dentro de regiões de alça.

Em algumas modalidades, o polipeptídeo de ligação peguilado compreende uma molécula de PEG covalentemente ligada ao grupo alfa amino do aminoácido N-terminal. Aminoação redutiva N-terminal sítio-específica é descrita em Pepinsky e outros, (2001) JPET, 297, 1059, e Patente U.S. No. 5.824.784. O uso de PEG-aldeído para a aminoação redutiva de uma proteína utilizando outros grupos amino nucleofílicos é descrito na Patente U.S. No. 4.002.531, em Wieder e outros, (1979) J. Biol. Chem. 254, 12579 e em Chamow e outros, (1994) Bioconjugate Chem. 5, 133.

Em outra modalidade, o polipeptídeo de ligação peguilado compreende uma ou mais moléculas de PEG covalentemente presas a um ligante o qual, por sua vez, é preso ao grupo alfa amino do resíduo de aminoácido no N-término do polipeptídeo de ligação. Tal abordagem é descrita na

Publicação U.S. No. 2002/0044921 e Publicação PCT No. WO94/01451.

Em uma modalidade, o polipeptídeo de ligação é peguilado no C-término. Em uma modalidade específica, uma proteína é peguilada no C-término através da introdução de azido-metionina C-terminal e a subsequente conjugação de um composto de metil-PEG-triarilfosfina via a reação de Staudinger. Esse método de conjugação C-terminal é descrito em Cazalis e outros, C-Terminal Site-Specific PEGylation of a Truncated Thrombomodulin Mutant with Retention of Full Bioactivity, *Bioconjug Chem.* 2004; 15(5): 1005-1009.

Monopeguilação de um polipeptídeo de ligação também pode ser produzida de acordo com os métodos descritos na Publicação PCT No. WO94/01451. O WO94/01451 descreve um método para o preparo de um polipeptídeo recombinante com um grupo reativo de alfa-carbono de aminoácido terminal modificado. As etapas do método envolvem formação do polipeptídeo recombinante e proteção do mesmo com um ou mais grupos de proteção biologicamente adicionados na alfa-carboxila C-terminal e alfa-amina N-terminal. O polipeptídeo pode, então, ser reagido com agentes de proteção química para proteger seletivamente grupos de cadeia lateral reativos e, desse modo, impedir os grupos de cadeia lateral de serem modificados. O polipeptídeo é, então, clivado com um reagente de clivagem específico para o grupo de proteção para formar um grupo reativo de alfa-carbono de aminoácido terminal. O grupo reativo de alfa-carbono de aminoácido terminal é modificado com um agente de modificação química. O polipeptídeo com uma única cópia terminalmente modificado com cadeia lateral protegida é, então, desprotegidos nos grupos de cadeia lateral para formar um polipeptídeo com uma única cópia recombinante terminalmente modificado. O número e sequência de etapas no método podem ser variados para obter modificação seletiva no aminoácido N- e/ou C-terminal do polipeptídeo.

A proporção de um polipeptídeo de ligação ao PEG ativado na reação de conjugação pode ser de cerca de 1:0,5 a 1:50, entre cerca de 1:1 a 1:30 ou de cerca de 1:5 a 1:15. Vários tampões aquosos podem ser usados no presente método para catalisar a adição covalente de PEG ao poli-

peptídeo de ligação. Em uma modalidade, o pH de um tampão usado é de cerca de 7,0 a 9,0. Em outra modalidade, o pH está em uma faixa ligeiramente básica, por exemplo, de cerca de 7,5 a 8,5. Tampões tendo uma pKa próxima da faixa de pH neutro podem ser usados, por exemplo, tampão de fosfato. Outras proporções serão usadas quando se faz proteínas PEG-ligadas multiespecíficas, tais como cerca de 1:4 a 1:8 ou cerca de 1:3 a 1:5.

Métodos convencionais de separação e purificação conhecidos na técnica podem ser usados para purificar o polipeptídeo de ligação PEGuilado, tais como cromatografia de exclusão de tamanho (por exemplo, filtração em gel) e troca de íons. Os produtos também podem ser separados usando SDS-PAGE. Produtos que podem ser separados incluem polipeptídeo de ligação mono-, di-, tri-, poli- e não-peguilado, bem como PEG livre. O percentual de conjugados de mono-PEG pode ser controlado empilhando as frações maiores em torno do pico de eluição para aumentar o percentual de mono-PEG na composição. Cerca de noventa por cento de conjugados de mono-PEG representa um bom equilíbrio de rendimento e atividade. Composições nas quais, por exemplo, pelo menos noventa e dois por cento ou pelo menos noventa e seis por cento dos conjugados são espécies mono-PEG podem ser desejadas. Em uma modalidade da presente invenção, o percentual de conjugados de mono-PEG é de noventa por cento a noventa e seis por cento.

Em uma modalidade, o polipeptídeo de ligação PEGuilado da invenção contém uma, duas ou mais porções PEG. Em uma modalidade, as porções PEG são ligadas a um resíduo de aminoácido o qual está sobre a superfície da proteína e/ou distante da superfície que contata o ligante alvo. Em uma modalidade, a massa molecular total ou combinada do PEG no polipeptídeo de PEG-ligação é de cerca de 3.000 Da a 60.000 Da, opcionalmente de cerca de 10.000 Da a 36.000 Da. Em uma modalidade, o PEG no polipeptídeo de ligação peguilado é um PEG de cadeia reta substancialmente linear.

Em uma modalidade da invenção, o PEG no polipeptídeo de ligação peguilado não é hidrolizado a partir do resíduo de aminoácido pegui-

lado usando um ensaio de hidroxilamina, por exemplo, hidroxilamina a 450 mM (pH de 6,5) durante 8 a 16 horas em temperatura ambiente e, assim, é estável. Em uma modalidade, mais de 80% da composição é um polipeptídeo de mono-PEG-ligação estável, mais preferivelmente pelo menos 90% e, ainda mais preferivelmente, pelo menos 95%.

Em outra modalidade, os polipeptídeos de ligação peguilados da invenção reterão, de preferência, pelo menos cerca de 25%, 50%, 60%, 70%, 80%, 85%, 90%, 95% ou 100% da atividade biológica associada à proteína não-modificada. Em uma modalidade, atividade biológica se refere à ligação ao VEGFR-2 ou IGF-IR, conforme avaliado pela K_D , k_{on} ou k_{off} . Em uma modalidade específica, a proteína polipeptídica de ligação peguilada mostra um aumento na ligação ao VEGFR ou IGF-IR com relação ao polipeptídeo de ligação não-peguilado.

A taxa de eliminação do soro de polipeptídeo PEG-modificado pode ser diminuída em cerca de 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80% ou mesmo 90% com relação à taxa de eliminação do polipeptídeo de ligação não-modificado. O polipeptídeo PEG-modificado pode ter uma meia-vida ($t_{1/2}$) a qual é intensificada com relação à meia-vida da proteína não-modificada. A meia-vida do polipeptídeo de PEG-ligação pode ser intensificada em pelo menos 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100%, 125%, 150%; 175%; 200%; 250%, 300%, 400% ou 500% ou mesmo 1000% com relação à meia-vida do polipeptídeo de ligação não-modificado. Em algumas modalidades, a meia-vida da proteína é determinada *in vitro*, tal como em uma solução salina tamponada ou soro. Em outras modalidades, a meia-vida da proteína é determinada *in vivo*, tal como a meia-vida da proteína no soro ou outro fluido corporal de um animal.

Modalidades de vetor & polinucleotídeo adicionais

Os ácidos nucleicos que codificam qualquer uma das várias proteínas ou polipeptídeos descritos aqui podem ser sintetizados quimicamente. Uso de códon pode ser selecionado de modo a melhorar a expressão em uma célula. Tal uso de códon dependerá do tipo de célula selecionado. Padrões especializados de uso de códon foram desenvolvidos para *E. coli* e

outras bactérias, bem como células de mamífero, células de planta, células de levedo e células de inseto. Vide, por exemplo: Mayfield e outros, *Proc Natl Acad Sci U S A.* 21 de Jan de 2003; 100(2): 438-42; Sinclair e outros *Protein Expr Purif.* Outubro de 2002; 26(1): 96-105; Connell ND. *Curr Opin Biotechnol.* Outubro de 2001; 12(5): 446-9; Makrides e outros *Microbiol Rev.* Setembro de 1996; 60(3): 512-38; e Sharp e outros *Yeast.* Outubro de 1991; 7(7): 657-78.

Técnicas gerais para manipulação de ácido nucleico são descritas, por exemplo, em Sambrook e outros, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Vols. 1-3, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2ª ed., 1989 ou F. Ausubel e outros, *Current Protocols in Molecular Biology* (Green Publishing and Wiley-Interscience: New York, 1987) e atualizações periódicas, aqui incorporados por referência. O DNA que codifica o polipeptídeo é operavelmente ligado a elementos regulatórios de transcrição ou tradução adequados derivados de genes de mamífero, virais ou de inseto. Tais elementos regulatórios incluem um promotor transcricional, uma sequência operadora opcional para controlar a transcrição, uma sequência que codifica sítios de ligação ribossômica de mRNA adequados e sequências que controlam o término de transcrição e tradução. A capacidade de replicar em um hospedeiro, usualmente conferida por uma origem de replicação, e um gene de seleção para facilitar o reconhecimento de transformantes são, adicionalmente, incorporados.

As proteínas da presente invenção podem ser produzidas recombinantemente não apenas diretamente, mas também como um polipeptídeo de fusão com um polipeptídeo heterólogo o qual é, de preferência, uma sequência sinalizadora ou outro polipeptídeo tendo um sítio de clivagem específico no N-término da proteína madura ou polipeptídeo. A sequência sinalizadora heteróloga selecionada é, de preferência, uma que é reconhecida e processada (isto é, clivada por uma peptidase sinalizadora) pela célula hospedeira. Para células hospedeiras procarióticas que não reconhecem e processam uma sequência sinalizadora nativa, a sequência sinalizadora é substituída por uma sequência sinalizadora procariótica selecionada, por exem-

plo, do grupo de líderes de fosfatase alcalina, penicilinase, lpp ou enterotoxi-
 na II termicamente estável. Para secreção em levedo, a sequência sinaliza-
 dora nativa pode ser substituída, por exemplo, pelo líder de invertase de le-
 vedo, um líder de fator (incluindo os líderes de .alfa.-fator de *Saccharomyces*
 5 e *Kluyveromyces*) ou o líder de fosfatase ácida, o líder de glicoamilase de *C.*
Albicans ou o sinal descrito na Publicação PCT No. WO90/13646. Em ex-
 pressão em células de mamífero, as sequências sinalizadoras de mamífero,
 bem como líderes secretórios virais, por exemplo, o sinal gD de herpes sim-
 plex, estão disponíveis. O DNA para tais regiões precursoras pode ser ligado
 10 em rede de leitura ao DNA que codifica a proteína.

Vetores de expressão de clonagem contêm uma sequência de
 ácido nucleico que permite que o vetor se reproduza em uma ou mais célu-
 las hospedeiras selecionadas. Geralmente, em vetores de clonagem, essa
 sequência é uma que permite que o vetor se reproduza independentemente
 15 do DNA cromossômico do hospedeiro e inclui origens de replicação ou se-
 quências de replicação autônoma. Tais sequências são bem-conhecidas
 para uma variedade de bactérias, levedos e vírus. A origem de replicação do
 plasmídeo pBR322 é adequada para a maioria das bactérias Gram-
 negativas, a origem do plasmídeo 2.mu. é adequada para levedo e várias
 20 origens virais (SV40, poliovírus, adenovírus, VSV ou BPV) são úteis para veto-
 res de clonagem em células de mamífero. Geralmente, o componente ori-
 gem de replicação não é necessário para vetores de expressão de mamífero
 (a origem do SV40 pode, tipicamente, ser usada sozinha porque ela contém
 o promotor precoce).

25 Vetores de expressão e clonagem podem conter um gene de
 seleção, também denominado um marcador selecionável. Genes de seleção
 típicos codificam proteínas que (a) conferem resistência a antibióticos ou
 outras toxinas, por exemplo, ampicilina, neomicina, metotrexato ou tetraciclina,
 (b) complementam deficiências auxotróficas ou (c) fornecem nutrientes
 30 críticos não disponíveis de meios complexos, por exemplo, o gene que codi-
 fica racemase de D-alanina para *Bacilos*.

Um exemplo de um esquema de seleção utiliza um fármaco para

interromper o crescimento de uma célula hospedeira. Aquelas células que são transformadas com sucesso com um gene heterólogo produzem uma proteína que confere resistência a fármaco e, assim, sobrevive ao regime de seleção. Exemplos de tal seleção dominante usam os fármacos neomicina, ácido micofenólico e higromicina.

Outro exemplo de marcadores selecionáveis adequados para células de mamífero ou eucarióticas são aqueles que permitem a identificação de células competentes para captar o ácido nucleico de anticorpo multivalente, tais como DHFR, quinase de timidina, metalotioneína-I e -II, de preferência os genes de metalotioneína de primata, deaminase de adenosina, decarboxilase de ornitina, etc. Por exemplo, células transformadas com o gene de seleção DHFR são primeiro identificadas através de cultura de todos os transformantes em um meio de cultura que contém metotrexato (Mtx), um antagonista competitivo de DHFR. Uma célula hospedeira apropriada, quando DHFR do tipo silvestre é empregada, é a linhagem de célula de ovário de hamster Chinês (CHO) deficiente em atividade de DHFR.

Alternativamente, células hospedeiras (particularmente hospedeiros do tipo silvestre que contêm DHFR endógeno) transformadas ou co-transformadas com sequências de DNA que codificam anticorpo multivalente, proteína DHFR do tipo silvestre e outro marcador selecionável, tal como 3'-fosfotransferase de aminoglicosídeo (APH) podem ser selecionadas através de crescimento celular em um meio contendo um agente de seleção para o marcador selecionável, tal como um antibiótico aminoglicosídico, por exemplo, canamicina, neomicina ou G418. Vide Patente U.S. No. 4.965.199.

Um gene de seleção adequado para uso em levedo é o gene *trp1* presente no plasmídeo de levedo YRp7 (Stinchcomb e outros, *Nature*, 282: 39 (1979)). O gene *trp1* proporciona um marcador de seleção para uma cepa mutante de levedo carecendo da capacidade de crescer em triptofano, por exemplo, ATCC No. 44076 ou PEP4-1. Jones, *Genetics*, 85: 12 (1977). A presença da lesão *trp1* no genoma da célula de levedo hospedeira proporciona, então, um ambiente eficaz para detecção de transformação através de crescimento na ausência de triptofano. Similarmente, cepas de levedo

Leu2-deficiente (ATCC 20.622 ou 38.626) são complementadas por plasmídeos conhecidos trazendo o gene Leu2.

Além disso, vetores derivados do plasmídeo circular 1.6. mu.m pKDI podem ser usados para transformação de levedos *Kluyveromyces*. Alternativamente, um sistema de expressão para a produção em larga escala de quimiosina de bezerro recombinante foi reportado para *K. lactis*. Van den Berg, *Bio/Technology*, 8: 135 (1990). Vetores de expressão com múltiplas cópias estáveis para secreção de albumina de soro humano recombinante madura por cepas industriais de *Kluyveromyces* também foram descritos. Flier e outros, *Bio/Technology*, 9: 968-975 (1991).

Vetores de expressão e clonagem usualmente contêm um promotor que é reconhecido pelo organismo hospedeiro e é operavelmente ligado ao ácido nucleico que codifica a proteína da invenção, por exemplo, uma proteína de armação baseada em fibronectina. Promotores adequados para uso com hospedeiros procarióticos incluem o promotor *phoA*, sistemas de promotor de beta-lactamase e lactose, fosfatase alcalina, um sistema promotor de triptofano (*trp*) e promotores híbridos, tal como o promotor *tac*. Contudo, outros promotores bacterianos conhecidos são adequados. Promotores para uso em sistemas bacterianos também conterão uma sequência de Shine-Dalgarno (S.D.) operavelmente ligada ao DNA que codifica a proteína da invenção.

Sequências promotoras são conhecidas para eucarióticas. Virtualmente todos os genes eucarióticos têm uma região rica em AT localizada aproximadamente 25 a 30 bases a montante do sítio onde transcrição é iniciada. Outra sequência encontrada 70 a 80 bases a montante do início de transcrição de muitos genes é uma região CNCAAT, onde n pode ser qualquer nucleotídeo. Na extremidade 3' da maioria dos genes eucarióticos, está uma sequência AATAAA que pode ser o sinal para adição da cauda poli A à extremidade 3' da sequência de codificação. Todas essas sequências são adequadamente inseridas em vetores de expressão eucarióticas.

Exemplos de sequências de promoção adequadas para uso com hospedeiros de levedo incluem promotores para a quinase de 3-

fosfoglicerato ou outras enzimas glicolíticas, tais como enolase, de-
hidrogenase de gliceraldeído-3-fosfato, hexoquinase, decarboxilase de piru-
vato, fosfofrutoquinase, isomerase de glicose-6-fosfato, mutase de 3-
fosfoglicerato, quinase de piruvato, isomerase de triosefosfato, isomerase de
5 fosfoglicose e glicoquinase.

Outros promotores de levedo, os quais são promotores induzíveis tendo a vantagem adicional de transcrição controlada por condições de crescimento, são as regiões promotoras para de-hidrogenase 2 de álcool, isocitocroma C, fosfatase ácida, enzimas degradativas associadas ao meta-
10 bolismo de nitrogênio, metalotioneína, de-hidrogenase de gliceraldeído-3-fosfato e enzimas responsáveis pela utilização de maltose e galactose. Vetores e promotores adequados para uso em expressão de levedo são ainda descritas na Publicação de Patente EP No. 73.657. Intensificadores de levedo são, vantajosamente, usados com promotores de levedo.

15 A transcrição a partir de vetores em células hospedeiras de mamífero pode ser controlada, por exemplo, por promotores obtidos dos genomas de vírus tais como políoma vírus, fowlpox vírus, adenovírus (tal como Adenovírus 2), papiloma vírus humano, sarcoma vírus aviário, citomegalovírus, um retrovírus, vírus de hepatite B e, mais preferivelmente, Vírus Simian
20 40 (SV40, de promotores de mamífero heterólogos, por exemplo, o promotor de actina ou um promotor de imunoglobulina, de promotores de choque térmico, contanto que tais promotores sejam compatíveis com os sistemas de célula hospedeira.

Os promotores tardio e precoce do vírus SV40 são, convenientemente, obtidos como um fragmento de restrição de SV40 que também contém a origem de replicação viral do SV40. O promotor precoce imediato do citomegalovírus humano é, convenientemente, obtido como um fragmento de restrição HindIII E. Um sistema para expressão de DNA em hospedeiros mamíferos usando o papiloma vírus bovino como um vetor é descrito na Pa-
25 tente U.S. No. 4.419.446. Uma modificação desse sistema é descrita na Patente U.S. No. 4.601.978. Vide também Reyes e outros, Nature 297: 598-601 (1982) sobre a expressão de cDNA de .beta-interferon humano em células
30

de camundongo sob o controle de um promotor de quinase de timidina a partir do vírus do herpes simplex. Alternativamente, a repetição terminal longa do vírus de Sarcoma de Rous pode ser usada como o promotor.

A transcrição de uma proteína de codificação de DNA da invenção por eucarióticas superiores é, frequentemente, aumentada através de inserção de uma sequência intensificadora no vetor. Muitas sequências intensificadoras são agora conhecidas de genes de mamífero (globina, elastase, albumina, alfa-fetoproteína e insulina). Tipicamente, contudo, se poderia usar um intensificador de um vírus de célula eucariótica, o intensificador de poliomax sobre o lado posterior da origem de replicação e intensificadores de adenovírus. Vide também Yaniv, Nature 297: 17-18 (1982) sobre elementos de intensificação para ativação de promotores eucarióticos. O intensificador pode sofrer *splicing* no vetor em uma posição 5' ou 3' à sequência de codificação de anticorpo multivalente mas, de preferência, está localizada em um sítio 5' do promotor.

Vetores de expressão usados em células hospedeiras eucarióticas (por exemplo, células de levedo, fungo, inseto, planta, animal, humanas ou nucleadas de outros organismos multicelulares) também conterão as sequências necessárias para o término da transcrição e estabilização do mRNA. Tais sequências estão comumente disponíveis a partir das regiões não-traduzidas 5' e, ocasionalmente, 3' de DNAs ou cDNAs eucarióticos ou virais. Essas regiões contêm segmentos de nucleotídeo transcritos como fragmentos poliadenilados na porção não-traduzida do mRNA que codifica o anticorpo multivalente. Um componente de término de transcrição útil é a região de poliadenilação de hormônio de crescimento bovino. Vide WO94/11026 e o vetor de expressão descrito aqui.

O DNA recombinante pode também incluir qualquer tipo de sequência de tag de proteína que pode ser útil para purificação da proteína. Exemplos de tags de proteína incluem, mas não estão limitados a, tag de histidina, uma tag FLAG, uma tag myc, uma tag de HA ou uma tag de GST. Vetores de clonagem e expressão apropriados para uso com hospedeiros celulares bacterianos, fúngicos, de levedo e mamífero podem ser encontra-

dos em Cloning Vectors: A Laboratory Manual, (Elsevier, New York, 1985), a descrição relevante do qual é aqui incorporada por referência.

O construto de expressão é introduzido na célula hospedeira usando um método apropriado para a célula hospedeira, conforme será evidente para aqueles versados na técnica. Uma variedade de métodos para introdução de ácidos nucleicos em células hospedeiras são conhecidos na técnica incluindo, mas não limitado a, eletroporação; transfecção empregando cloreto de cálcio, cloreto de rubídio, fosfato de cálcio, DEAE-dextrana ou outras substâncias; bombardeamento de microprojétil; lipofecção; e infecção (onde o vetor é um agente infeccioso).

Células hospedeiras adequadas incluem células procarióticas, de levedo, células de mamífero ou bacterianas. Bactérias adequadas incluem organismos gram negativos ou gram positivos, por exemplo, *E. coli* ou *Bacillus* spp. Levedo, de preferência da espécie *Saccharomyces*, tal como *S. cerevisiae*, pode também ser usado para a produção de polipeptídeos. Vários sistemas de cultura de células de mamífero ou inseto também podem ser empregados para expressar proteínas recombinantes. Sistemas de baculovírus para a produção de proteínas heterólogas em células de inseto são revistos por Luckow e Summers, (Bio/Technology, 6: 47, 1988). Exemplos de linhagens de células hospedeiras de mamífero adequadas incluem células endoteliais, células de rim de macaco COS-7, CV-1, células L, C127, 3T3, células de ovário de hamster Chinês (CHO), células de rim embrionário humano, as linhagens de células HeLa, 293, 293T e BHK. Polipeptídeos purificados são preparados através de cultura de sistemas de vetor/hospedeiro adequados para expressar as proteínas recombinantes. Para muitas aplicações, o pequeno tamanho de muitos dos polipeptídeos descritos aqui tornará a expressão em *E. coli* como o método preferido para expressão. A proteína é, então, purificada do meio de cultura ou extratos de célula.

Modalidades de expressão & células adicionais

Proteínas preferidas para modalidades de produção e células são armações baseadas em fibronectina e proteínas relacionadas. Células hospedeiras adequadas para clonagem e expressão do DNA nos vetores

aqui são as células procarióticas, de levedo ou superiores descritas acima. Procarióticos adequados para essa finalidade incluem eubactérias, tais como organismos Gram-negativos ou Gram-positivos, por exemplo, Enterobacteriaceae, tal como Escherichia, por exemplo, *E. coli*, Enterobacter, Erwinia, Klebsiella, Proteus, Salmonella, por exemplo, Salmonella typhimurium, Serratia, por exemplo, Serratia marcescens e Shigella, bem como Bacilos, tais como B. subtilis e B. licheniformis (por exemplo, B. licheniformis 41 P descrito no DD 266.710, publicado em 12 de Abril de 1989), Pseudomonas, tal como P. Aeruginosa e Streptomyces. Um hospedeiro de clonagem de *E. coli* preferido é *E. coli* 294 (ATCC 31.446), embora outras cepas, tais como *E. coli* B, *E. coli* X1776 (ATCC 31.537) e *E. coli* W3110 (ATCC 27.325) sejam adequadas. Esses exemplos são ilustrativos ao invés de limitativos.

Além de procarióticos, micróbios eucarióticos, tais como fungos filamentosos ou levedo, são hospedeiros de clonagem ou expressão adequados para vetores de codificação de proteína. Saccharomyces cerevisiae ou levedo de padaria comum é o mais comumente usado dentre os microorganismos hospedeiro eucarióticos inferiores. Contudo, uma série de outros gêneros, espécies e cepas estão comercialmente disponíveis e são úteis aqui, tais como Schizosaccharomyces pombe; hospedeiros Kluyveromyces tais como, por exemplo, K. lactis, K. fragilis (ATCC 12,424), K. bulgaricus (ATCC 16,045), K. Wickerhamii (ATCC 24,178), K. waltii (ATCC 56,500), K. drosophilum (ATCC 36,906), K. Thermotolerans e K. marxianus; Yarrowia (Publicação de Patente EP No. 402,226); Pichia pastoris (Publicação de Patente EP No. 183.070); Candida; Trichoderma reesei (Publicação de Patente EP No. 244.234); Neurospora crassa; Schwanniomyces, tal como Schwanniomyces occidentalis; e fungos filamentosos tais como, por exemplo, hospedeiros Neurospora, Penicillium, Tolypocladium e Aspergillus, tais como A. nidulans e A. niger.

Células hospedeiras adequadas para a expressão de proteínas glicosiladas da invenção são derivadas de organismos multicelulares. Exemplos de células de invertebrado incluem células de planta e inseto. Numerosas cepas baculovirais e variantes e células hospedeiras de inseto permissi-

vas correspondentes de hospedeiros tais como *Spodoptera frugiperda* (lagarta), *Aedes aegypti* (mosquito), *Aedes albopictus* (mosquito), *Drosophila melanogaster* (mosca da fruta) e *Bombyx mori* foram identificadas. Uma variedade de cepas virais para transfecção estão publicamente disponíveis, por exemplo, a variante L-1 de *Autographa californica* NPV e a cepa Bm-5 de *Bombyx mori* NPV e tais vírus podem ser usados como os vírus aqui, de acordo com a presente invenção, particularmente para transfecção de células de *Spodoptera frugiperda*.

Em alguns casos, será desejado produzir as proteínas em células de vertebrado, tal como glicosilação e propagação de células de vertebrado em cultura (cultura tecidual) se tornou um procedimento de rotina. Exemplos de linhagens de células hospedeiras de mamífero úteis são a linhagem CV1 de rim de macaco transformada por SV40 (COS-7, ATCC CRL 1651); a linhagem de rim embrionário humano (células 293 ou 293 subclonadas para crescimento em cultura em suspensão, Graham e outros, J. Gen Virol. 36: 59. (1977)); células de rim de hamster bebê (BHK, ATCC CCL 10); células de ovário de hamster Chinês/-DHFR (CHO, Urlaub e outros, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77: 4216 (1980)); células de Sertoli de camundongo (TM4, Mather, Biol. Reprod. 23: 243-251 (1980)); células de rim de macaco (CV1 ATCC CCL 70); células de macaco African Green (VERO-76, ATCC CRL-1587); células de carcinoma cervical humano (HELA, ATCC CCL 2); células de rim canino (MDCK, ATCC CCL 34); células de fígado de rato (BRL 3A, ATCC CRL 1442); células de pulmão humano (W138, ATCC CCL 75); células de fígado humano (Hep G2, HB 8065); tumor mamário de camundongo (MMT 060562, ATCC CCL51); células TR1 (Mather e outros, Annals N.Y. Acad. Sci. 383: 44-68 (1982)); células MRC5; células FS4; uma linhagem de hepatoma humano (Hep G2); e células de mieloma ou linfoma (por exemplo, células Y0, J558L, P3 e NS0) (vide Patente U.S. No. 5.807.715). Culturas de células de planta de algodão, milho, batata, soja, petúnia, tomate e tabaco também podem ser utilizadas como hospedeiros.

Células hospedeiras são transformadas com os vetores de expressão ou clonagem descritos aqui para a produção de proteína e cultiva-

das em meios nutrientes convencionais modificados, conforme apropriado, para indução de promotores, seleção de transformantes ou amplificação de genes que codificam as sequências desejadas.

Cultura de células

5 As células hospedeiras usadas para produzir as proteínas da presente invenção podem ser cultivadas em uma variedade de meios. Meios comercialmente disponíveis, tais como Ham's F10 (Sigma), Meio Mínimo Essencial ((MEM), (Sigma), RPMI-1640 (Sigma) e Meio de Eagle Modificado de Dulbecco ((DMEM), Sigma) são adequados para cultura das células hos-

10 pedeiras. Além disso, qualquer um dos meios descritos em Ham e outros, Meth. Enz. 58: 44 (1979), Barnes e outros, Anal. Biochem. 102: 255 (1980), Patentes U.S. Nos. 4.767.704; 4.657.866; 4.927.762; 4.560.655; ou 5.122.469; WO90/03430; WO87/00195; ou Patente U.S. No. Re. 30.985 podem ser usados como meios de cultura para as células hospedeiras. Qual-

15 quer um desses meios pode ser suplementado, conforme necessário, com hormônios e/ou outros fatores de crescimento (tais como insulina, transferri- na ou fator de crescimento epidérmico), sais (tais como cloreto de sódio, cálcio, magnésio e fosfato), tampões (tal como HEPES), nucleotídeos (tais co-

20 mo adenosina e timidina), antibióticos (tal como o fármaco GENTAMY- CIN™), elementos vestigiais (definidos como compostos inorgânicos usual- mente presentes em concentrações finais na faixa de micromolar) e glicose ou uma fonte de energia equivalente. Quaisquer outros suplementos neces-

25 sários podem também ser incluídos em concentrações apropriadas que se- rão conhecidas por aqueles versados na técnica. As condições de cultura, tais como temperatura, pH e similares, são aquelas previamente usadas com a célula hospedeira selecionada para expressão e serão evidentes para a-

queles versados na técnica.

Proteínas descritas aqui também podem ser produzidas usando sistemas de tradução-célula. Para tais finalidades, os ácidos nucleicos que

30 codificam o polipeptídeo devem ser modificados para permitir transcrição *in vitro* para produzir mRNA e permitir tradução isenta de célula do mRNA no sistema isento de célula particular que está sendo utilizado (sistema de tra-

dução isento de célula eucariótica, tal como um mamífero ou levedo ou procariótico, tal como um sistema de tradução isento de célula bacteriano).

As proteínas da invenção também podem ser produzidas através de síntese química (por exemplo, através dos métodos descritos em Solid Phase Peptide Synthesis, 2ª ed., 1984, The Pierce Chemical Co., Rockford, IL). Modificações na proteína também podem ser produzidas através de síntese química.

As proteínas da presente invenção podem ser purificadas através de métodos de isolamento/purificação para proteínas geralmente conhecidas no campo de química de proteína. Exemplos não-limitantes incluem extração, recristalização, salinização (por exemplo, com sulfato de amônio ou sulfato de sódio), centrifugação, diálise, ultrafiltração, cromatografia por adsorção, cromatografia de troca de íons, cromatografia hidrofóbica, cromatografia em fase normal, cromatografia de fase reversa, filtração em gel, cromatografia por permeação de gel, cromatografia por afinidade, eletroforese, distribuição contracorrente ou quaisquer combinações desses. Após purificação, os polipeptídeos podem ser permutados em diferentes tampões e/ou concentrados através de qualquer um de uma variedade de métodos conhecidos na técnica incluindo, mas não limitado a, filtração e diálise.

O polipeptídeo purificado é, de preferência, pelo menos 85% puro, mais preferivelmente pelo menos 95% puro e, ainda mais preferivelmente, pelo menos 98% puro. A despeito do valor numérico exato da pureza, o polipeptídeo é suficientemente puro para uso como um produto farmacêutico.

25 Modalidades de glicosilação adicionais

Em algumas modalidades, pode ser preferível glicosilar as proteínas da invenção. De preferência, tais proteínas são armações baseadas em fibronectina. Armações baseadas em fibronectina normalmente contêm sítios de glicosilação, contudo, tal glicosilação pode ser manipulada na proteína.

A glicosilação de proteínas é, tipicamente, N-ligada ou O-ligada. N-ligada se refere à fixação da porção carboidrato à cadeia lateral de um resíduo de asparagina. As sequências tripeptídicas asparagina-X-serina e

asparagina-X-treonina, onde X é qualquer aminoácido exceto prolina, são as sequências de reconhecimento para fixação enzimática da porção carboidrato à cadeia lateral de asparagina. Essas podem ser manipuladas nas proteínas da invenção, em particular proteínas de armação baseada em fibronectina e seus polinucleotídeos correspondentes. Assim, a presença de qualquer uma dessas sequências tripeptídicas em um polipeptídeo cria um sítio de glicosilação potencial. Glicosilação O-ligada se refere à fixação de um dos açúcares N-acetilgalactosamina, galactose ou xilose a um hidróxi aminoácido, mais comumente serina ou treonina, embora 5-hidroxiprolina ou 5-hidróxilisina possam também ser usadas.

A adição de sítios de glicosilação às proteínas da invenção é, convenientemente, realizada alterando a sequência de aminoácido, de modo que ela contenha uma ou mais das sequências tripeptídicas descritas acima (para sítios de glicosilação N-ligados). A alteração também pode ser feita através da adição de ou substituição de um ou mais resíduos de serina ou treonina pela sequência do anticorpo original (para sítios de glicosilação O-ligados).

Moléculas de ácido nucleico que codificam tais variantes de sequência de aminoácido das proteínas da invenção são preparadas através de uma variedade de métodos conhecidos na técnica. Esses métodos incluem, mas não estão limitados a, isolamento de uma fonte natural (no caso de variantes de sequência de aminoácido que ocorrem naturalmente) ou preparo através de mutagênese oligonucleotídeo-mediada (ou sítio-dirigida), mutagênese por PCR e mutagênese de cassete de uma variante anteriormente preparada ou uma versão não-variante da proteína (por exemplo, proteína de armação baseada em fibronectina).

Pode ser desejável modificar as proteínas da invenção com relação à função efetuada, por exemplo, de modo a intensificar a citotoxicidade célula-mediada anticorpo-dependente (ADCC) e/ou citotoxicidade complemento-dependente (CDC) do anticorpo. Isso pode ser obtido através de introdução de uma porção ativa de uma região Fc, bem como uma ou mais modificações de aminoácido em uma região Fc da proteína (por exem-

plo, proteína de armação baseada em fibronectina), desse modo, gerando uma região Fc variante. A variante de região Fc pode compreender uma sequência de região Fc humana (por exemplo, uma região Fc de IgG1, IgG2, IgG3 ou IgG4) compreendendo uma modificação de aminoácido (por exemplo, uma substituição) em uma ou mais posições de aminoácido.

Em uma modalidade, a região Fc variante pode mediar a citotoxicidade célula-mediada anticorpo-dependente (ADCC) na presença de células efetadoras humanas mais eficazmente ou a ligação a um receptor Fc gama (Fc γ R) com melhor afinidade do que uma região Fc de sequência nativa. Tais variantes de região Fc podem compreender uma modificação de aminoácido em qualquer uma ou mais das posições 256, 290, 298, 312, 326, 330, 333, 334, 360, 378 ou 430 da região Fc, em que a numeração dos resíduos na região Fc é aquela do índice Norte Americano, conforme em Kabat.

Proteínas baseadas em anticorpo adicional, incluindo porções e derivados

Modalidades adicionais da invenção incluem anticorpos com um único domínio cujas regiões de determinação de complementaridade são parte da invenção. De preferência, dirigidos ao IGF-IR, bem como incluídos nas proteínas PEG-ligadas da invenção. Exemplos incluem, mas não estão limitados a, anticorpos com cadeia pesada, anticorpos naturalmente desprovidos de cadeias leves, anticorpos com um único domínio derivados de anticorpos com 4-cadeias convencionais, anticorpos manipulados e outras armações com um único domínio que não aqueles derivados de anticorpos. Anticorpos com um único domínio podem ser qualquer um dos anticorpos únicos da técnica ou futuros. Anticorpos com um único domínio podem ser derivados de quaisquer espécies incluindo, mas não limitado a, camundongo, ser humano, camelo, lhama, cabra, coelho, bovino. De acordo com um aspecto da invenção, anticorpos com um único domínio, conforme usado aqui, são um anticorpo com um único domínio que ocorre naturalmente conhecido como anticorpo com cadeia pesada desprovido de cadeias leves. Tais anticorpos com um único domínio são descritos no WO94/04678, por exemplo. Por razões de clareza, esse domínio variável derivado de um anti-

corpo com cadeia pesada naturalmente desprovido de cadeia leve é conhecido aqui como um VHH ou nanocorpo para distingui-lo do VH convencional de imunoglobulinas com quatro cadeias. Tal molécula de VHH pode ser derivada de anticorpos estimulados em espécies Camelidae, por exemplo, em camelos, dromedários, lhama, vicuna, alpaca e guanaco. Outras espécies, além de Camelidae, podem produzir anticorpos com cadeia pesada naturalmente desprovidos de cadeia leve; tais VHHs estão dentro do escopo da invenção.

VHHs, de acordo com a presente invenção e conforme conhecido por aqueles versados na técnica são domínios variáveis de cadeia pesada derivados de imunoglobulinas naturalmente desprovidas de cadeias leves, tais como aquelas derivadas de Camelídeo, conforme descrito no WO94/04678 (e referidos aqui depois como domínios VHH ou nanocorpos). Moléculas VHH são cerca de 10 vezes menores do que moléculas de IgG. Eles são polipeptídeos únicos e muito estáveis, resistindo à condições extremas de pH e temperatura. Além disso, eles são resistentes à ação de proteases, o que não é o caso para anticorpos convencionais. Além disso, expressão *in vitro* de VHHs produz VHHs funcionais apropriadamente duplicados de alto rendimento. Além disso, anticorpos gerados em Camelídeos reconhecerão outros epítomos que não aqueles reconhecidos por anticorpos gerados *in vitro* através do uso de bibliotecas de anticorpo ou via imunização de outros mamíferos que não Camelídeos (WO9749805). Como tal, VHH's anti EGFR podem interagir mais eficientemente com o EGFR do que anticorpos convencionais, desse modo, bloqueando sua interação com o(s) ligante(s) de EGFR mais eficientemente. Uma vez que VHH's são conhecidos por se ligar a epítomos "incomuns", tais como cavidades ou ranhuras (WO97/49805), a afinidade de tais VHH's podem ser mais adequados para tratamento terapêutico.

Outra modalidade da presente invenção é um antirreceptor de Fator de Crescimento Epidérmico, consistindo em uma sequência correspondendo àquela de um VHH de Camelídeo dirigido ao EGFR ou um membro da família intimamente relacionado. A invenção também se refere a uma

sequência homóloga, uma porção de função ou uma porção funcional de uma sequência homóloga do referido polipeptídeo. A invenção também se refere a ácidos nucleicos capazes de codificar os referidos polipeptídeos. Um anticorpo com um único domínio da presente invenção pode ser dirigido
5 contra o EGFR ou um membro da família intimamente relacionado.

De acordo com a invenção e conforme discutido aqui, um construto polipeptídico pode ainda compreender anticorpos com um único domínio dirigidos contra outros alvos tal como, por exemplo, albumina de soro. Um anticorpo com um único domínio dirigido contra um alvo significa um anticorpo com um único domínio que é capaz de ligação ao referido alvo com
10 uma afinidade de mais de 10^{-6} M.

A presente invenção ainda se refere a anticorpos com um único domínio, como um VHH pertencendo a uma classe tendo sequências similares às humanas. Uma de tais classes é caracterizada pelo fato de que os
15 VHHs trazem um aminoácido do grupo consistindo em glicina, alanina, valina, leucina, isoleucina, prolina, fenilalanina, tirosina, triptofano, metionina, serina, treonina, asparagina ou glutamina na posição 45 tal como, por exemplo, L45 e um triptofano na posição 103, de acordo com a numeração de Kabat. Como tal, polipeptídeos pertencendo a essa classe de anticorpo mos-
20 tram uma alta homologia de sequência com as regiões da estrutura VH humanas e os referidos polipeptídeos poderiam ser administrados a um ser humano diretamente sem esperar uma resposta imune indesejada dos mesmos e sem a carga de humanização adicional.

Outra classe similar a ser humano de anticorpos com domínio
25 único de Camelídeo foram descritas na Publicação PCT No. WO03/035694 e contêm os resíduos hidrofóbicos FR2 tipicamente encontrados em anticorpos convencionais de origem humana ou outras espécies, mas compensando essa perda de hidrofiliidade pelo resíduo de arginina carregado na posição 103 que substitui o resíduo de triptofano conservado presente em VH de
30 anticorpos com cadeia dupla. Como tal, peptídeos pertencendo a essas duas classes mostram uma alta homologia de sequência com as regiões da estrutura VH e os referidos peptídeos poderiam ser administrados a um ser hu-

mano diretamente sem esperar uma resposta imune indesejada dos mesmos e sem a carga de humanização adicional. A invenção também se refere a ácidos nucleicos capazes de codificar os referidos polipeptídeos. Polipeptídeos podem incluir os anticorpos de Camelídeo de comprimento total, isto é, domínios Fc e VHH.

VHH's antialbumina podem interagir de uma forma mais eficaz com albumina do soro, a qual é conhecida por ser uma proteína veículo. Como uma proteína veículo, alguns dos epítomos de albumina do soro podem ser inacessíveis pelas proteínas ligadas, peptídeos e pequenos compostos químicos. Uma vez que VHH's são conhecidos por se ligar a epítomos incomuns ou não-convencionais, tais como cavidades (WO97/49805), a afinidade de tais VHH's pela albumina em circulação pode ser mais adequada para a invenção. A proteína de soro pode ser qualquer proteína adequada encontrada no soro do indivíduo ou fragmento da mesma. Em um aspecto da invenção, a proteína de soro é albumina, imunoglobulinas de soro, proteína de ligação à tiroxina, transferrina ou fibrinogênio. Dependendo do uso pretendido, tal como a meia-vida requerida para tratamento eficaz e/ou compartimentalização do antígeno alvo, o VHH-parceiro pode ser dirigido a uma das proteínas de soro acima.

"Fragmentos de anticorpo" compreendem apenas uma porção de um anticorpo intacto, geralmente incluindo um sítio de ligação a antígeno do anticorpo intacto e, assim, retendo a capacidade de ligação a antígeno. Exemplos de fragmentos de anticorpo abrangidos pela presente definição incluem: (i) o fragmento Fab, tendo domínios VL, CL, VH e CH1; (ii) o fragmento Fab', o qual é um fragmento Fab tendo um ou mais resíduos de cisteína no C-término do domínio CH1; (iii) o fragmento Fd tendo domínios VH e CH1; (iv) o fragmento Fd' tendo domínios VH e CH1 e um ou mais resíduos de cisteína no C-término do domínio CH1; (v) o fragmento Fv tendo os domínios VL e VH de um único braço de um anticorpo; (vi) o fragmento dAb (Ward e outros, Nature 341, 544-546 (1989)), o qual consiste em um domínio VH; (vii) regiões CDR isoladas; (viii) fragmentos F(ab').sub.2, um fragmento bivalente incluindo dois fragmentos Fab' ligados através de uma ligação em

ponte de dissulfeto na região de dobradiça; (ix) moléculas de anticorpo com uma única cadeia (por exemplo, Fv com uma única cadeia; scFv) (Bird e outros, Science 242: 423-426 (1988); e Huston e outros, PNAS (USA) 85: 5879-5883 (1988)); (x) "diacorpos" com dois sítios de ligação a antígeno, compreendendo um domínio variável de cadeia pesada (VH) conectado a um domínio variável de cadeia leve (VL) na mesma cadeia polipeptídica (vide, por exemplo, Publicação de Patente EP No. 404.097; W093/11161; e Hollinger e outros, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90: 6444-6448 (1993)); (xi) "anticorpos lineares" compreendendo um par de segmentos Fd aleatórios (VH-CH1-VH-CH1) os quais, junto com polipeptídeos de cadeia leve complementares, formam um par de regiões de ligação a antígeno (Zapata e outros, Protein Eng. 8(10): 1057-1062 (1995); e Patente U.S. No. 5.641.870).

Várias técnicas têm sido empregadas para a produção de fragmentos de anticorpo que podem ser usados para fazer fragmentos de anticorpo usados na invenção. Tradicionalmente, esses fragmentos foram derivados via digestão proteolítica de anticorpos intactos (vide, por exemplo, Morimoto e outros, Journal of Biochemical and Biophysical Methods 24: 107-117 (1992); e Brennan e outros, Science, 229: 81 (1985)). Contudo, esses fragmentos podem agora ser produzidos diretamente por células hospedeiras recombinantes. Por exemplo, os fragmentos de anticorpo podem ser isolados das bibliotecas de fago de anticorpo discutidas acima. Alternativamente, fragmentos Fab'-SH podem ser diretamente recuperados de *E. coli* e quimicamente acoplados para formar fragmentos F(ab').sub.2 (Carter e outros, Bio/Technology 10: 163-167 (1992)). De acordo com outra abordagem, fragmentos F(ab').sub.2 podem ser isolados diretamente a partir da cultura de células hospedeiras recombinantes. Outras técnicas para a produção de fragmentos de anticorpo serão evidentes para aqueles versados na técnica. Em outras modalidades, o anticorpo de escolha é um fragmento Fv de cadeia única (scFv). Vide WO 93/16185; Patente U.S. No. 5.571.894; e Patente U.S. No. No. 5.587.458. O fragmento de anticorpo pode também ser um "anticorpo linear", por exemplo, conforme descrito na Patente U.S. No. 5.641.870, por exemplo. Tais fragmentos de anticorpo lineares podem ser

monoespecíficos ou biespecíficos.

Produtos terapêuticos de proteína objetivados alternativos

Em determinadas modalidades, as proteínas da invenção descritas aqui podem compreender uma ou mais sequências de avímero. Avímeros são um tipo de proteínas de ligação que têm afinidades e especificidades por várias moléculas alvo, incluindo aquelas descritas aqui. Essas proteínas podem ser incluídas nas modalidades PEG-ligadas da invenção. Elas foram desenvolvidas a partir de domínios de receptor extracelular humano por meio de embaralhamento de éxon *in vitro* e phage display (Silverman e outros, 2005, Nat. Biotechnol. 23: 1493-94; Silverman e outros, 2006, Nat. Biotechnol. 24: 220). As proteínas com multidomínio resultantes podem compreender múltiplos domínios de ligação independentes, que podem exibir afinidade (em alguns casos, subnanomolar) e especificidade aperfeiçoadas comparado com proteínas de ligação com um único epítipo. Em várias modalidades, avímeros podem ser presos, por exemplo, com PEG ou ligantes polipeptídicos. Detalhes adicionais referentes a métodos de construção e uso de avímeros são descritos, por exemplo, nas Publicações de Patente U.S. Nos. 20040175756, 20050048512, 20050053973, 20050089932 e 20050221384, a seção Exemplos de cada uma das quais é incorporada aqui por referência, bem como o documento todo.

Em determinadas modalidades, as proteínas da invenção descritas aqui podem compreender uma ou mais sequências relacionadas à lipocalina, por exemplo, anticalinas ou derivados de lipocalina. Anticalinas ou derivados de lipocalina são um tipo de proteínas de ligação que têm afinidades e especificidades por várias moléculas alvo, incluindo aquelas descritas aqui. Tais proteínas são descritas na Publicação de Patente US No. 20060058510 - Anticalinas, Publicação de Patente US No. 20060088908 - "Muteins of human neutrophil gelatinase-associated lipocalin and related proteins", Publicação de Patente US No. 20050106660 - "Muteins of apolipoprotein d" e Publicação PCT No. WO2006/056464. Essas proteínas podem ser incluídas nas modalidades PEG-ligadas da invenção.

Em determinadas modalidades, as proteínas da invenção descri-

tas aqui podem compreender uma ou mais sequências relacionadas à lectina de tetranectina do tipo C ou trinectinas, por exemplo, lectina de tetranectina do tipo C ou derivados de lectina de tetranectina do tipo C. Lectinas de tetranectina do tipo C ou derivados de lectina de tetranectina do tipo C são um tipo de proteínas de ligação que têm afinidades e especificidades por várias moléculas alvo, incluindo aquelas descritas aqui. Diferentes lectinas de tetranectina do tipo C e proteínas relacionadas são descritos nas Publicações PCT Nos. WO2006/053568, WO2005/080418, WO2004/094478, WO2004/039841, WO2004/005335, WO2002/048189, WO98/056906 e Publicação de Patente U.S. No. 20050202043. Essas proteínas podem ser incluídas nas modalidades PEG-ligadas da invenção.

Em determinadas modalidades, as proteínas da invenção descritas aqui podem compreender uma ou mais proteínas com repetição de anquirina naturais por exemplo, DARPinas (Molecular Partners).

Em determinadas modalidades, as proteínas da invenção descritas aqui podem compreender um ou mais Affibodies™. Affibodies™ são derivados do domínio de ligação de IgG de Proteína A estafilocócica. Novas propriedades de ligação podem ser obtidas alterando resíduos localizados próximo da superfície de ligação do domínio de Proteína A.

Em determinadas modalidades, as proteínas da invenção podem compreender uma ou mais armações de proteína baseadas em nó de cisteína, isto é, microcorpos (Selecure/NascaCell).

Em determinadas modalidades, as proteínas da invenção descritas aqui podem compreender um ou mais transcorpos. Transcorpos são baseados em armações de transferrina (BioResis/Pfizer).

Em determinadas modalidades, as proteínas descritas aqui podem compreender proteínas de ligação baseadas em gama-cristalina ou ubiquitina. Essas assim denominadas moléculas Affilin™ (Scil Proteins) são caracterizadas pelo design de novo de uma região de ligação em estruturas de beta folha das proteínas. Moléculas Affilin™ foram descritas na Publicação U.S. No. 20070248536.

Toxinas e outras moléculas ligadas à proteínas da invenção

As proteínas da invenção, conforme descrito aqui, podem ser ligadas a um agente citotóxico. Tais modalidades podem ser preparadas através de métodos *in vivo* ou *in vitro*, conforme apropriado. Métodos *in vitro* incluem química de conjugação bem-conhecida na técnica, incluindo química compatível com proteínas, tal como química para aminoácidos específicos, tais como Cys e Lys. De forma a ligar um agente citotóxico a uma proteína da invenção, um grupo de ligação ou grupo reativo é usado. Grupos de ligação adequados são bem-conhecidos na técnica e incluem grupos dissulfeto, grupos tioéter, grupos instáveis a ácido, grupos fotoinstáveis, grupos instáveis à peptidase e grupos instáveis à esterase. Grupos de ligação preferidos são grupos dissulfeto e grupos tioéter. Por exemplo, conjugados podem ser construídos usando uma reação de troca de dissulfeto ou através de formação de uma ligação de tioéter entre o anticorpo e o agente citotóxico. Agentes citotóxicos preferidos são maitansinoides, taxanos e análogos de CC-1065.

Métodos *in vivo* incluem ligação tóxica, marcação ou rotulação de proteínas às proteínas da invenção como proteínas de fusão. Um único polipeptídeo é produzido usando um polinucleotídeo de codificação para o polipeptídeo desejado. Proteínas tóxicas podem ser controladas através de expressão em células insensíveis ou resistentes à toxina ou com promotores induzíveis em células que são sensíveis.

Embora não-limitante, em várias modalidades, as proteínas da invenção podem ser ligadas à proteínas tais como uma toxina bacteriana, uma toxina de planta, ricina, abrina, uma ribonuclease (RNase), DNase I, uma protease, enterotoxina A estafilocócica, proteína antiviral de erva-dos-cancros, gelonina, toxina de difteria, exotoxina de *Pseudomonas*, endotoxina de *Pseudomonas*, Ranpimase (Rap), Rap (N69Q), uma enzima ou uma proteína fluorescente.

Maitansinoides e análogos de maitansinoides estão entre os agentes citotóxicos preferidos. Exemplos de maitansinoides adequados incluem maitansinol e análogos de maitansinol. Maitansinoides adequados são descritos nas Patentes U.S. Nos. 4.424.219; 4.256.746; 4.294.757;

4.307.016; 4.313.946; 4.315.929; 4.331.598; 4.361.650; 4.362.663;
4.364.866; 4.450.254; 4.322.348; 4.371.533; 6.333.410; 5.475.092;
5.585.499; e 5.846.545.

5 Taxanos também são agentes citotóxicos preferidos. Taxanos adequados para uso na presente invenção são descritos nas Pats. U.S. Nos. 6.372.738 e 6.340.701.

10 CC-1065 e seus análogos são também fármacos citotóxicos preferidos para uso na presente invenção. CC-1065 e seus análogos são descritos nas Patentes U.S. Nos. 6.372.738; 6.340.701; 10 5.846.545 e 5.585.499.

15 Um candidato atraente para o preparo de tais conjugados citotóxicos é CC-1065, o qual é um antibiótico antitumor potente isolado do caldo de cultura de *Streptomyces zelensis*. CC-1065 é cerca de 1000 vezes mais potente *in vitro* do que os fármacos anticâncer comumente usados, tais como doxorrubicina, metotrexato e vincristina (B. K. Bhuyan e outros, Cancer Res., 42, 3532-3537 (1982)).

20 Fármacos citotóxicos, tais como as metotrexato, daunorubicina, doxorrubicina, vincristina, vinblastina, melphalan, mitomicina C, clorambucila e calicheamicina, também são adequados para o preparo de conjugados da presente invenção e as moléculas de fármaco também podem ser ligadas às moléculas de anticorpo através de uma molécula veículo intermediária, tal como albumina de soro.

25 Para aplicações diagnósticas, os anticorpos da presente invenção serão, tipicamente, rotulados com uma porção detectável. A porção detectável pode ser qualquer uma a qual é capaz de produção, seja direta ou indiretamente, de um sinal detectável. Por exemplo, a porção detectável pode ser um radioisótopo, tal como H3, C14 ou 13, P32, S35 ou I131; um composto fluorescente ou quimioluminescente, tal como isotiocianato de fluoresceína, rodamina ou luciferina; ou uma enzima, tal como fosfatase alcalina,
30 beta-galactosidase ou peroxidase de amorácia.

Conjugação

Qualquer método conhecido na técnica para a conjugação de

uma proteína à porção detectável pode ser empregado, incluindo aqueles métodos descritos por Hunter, e outros, *Nature* 144: 945 (1962); David, e outros, *Biochemistry* 13: 1014 (1974); Pain e outros, *J. Immunol. Meth.* 40: 219 (1981); e Nygren, *J. Histochem. and Cytochem.* 30: 407 (1982). Métodos *in vitro* incluem química de conjugação bem-conhecida na técnica, incluindo química compatível com proteínas, tal como química para aminoácidos específicos, tais como Cys e Lys. De forma a ligar uma porção (tal como PEG) a uma proteína da invenção, um grupo de ligação ou grupo reativo é usado. Grupos de ligação adequados são bem-conhecidos na técnica e incluem grupos dissulfeto, grupos tioéter, grupos instáveis a ácido, grupos fotoinstáveis, grupos instáveis à peptidase e grupos instáveis à esterase. Grupos de ligação preferidos são grupos dissulfeto e grupos tioéter, dependendo da aplicação. Para armações baseadas em fibronectina ou outras proteínas com um aminoácido cys, uma cys pode ser manipulada em um local para permitir que a atividade da proteína exista, ao mesmo tempo em que cria um local para conjugação.

Formação de imagem e outras aplicações

As proteínas da invenção também são úteis para formação de imagem *in vivo*, em que uma proteína rotulada com uma porção detectável, tal como um agente radio-opaco ou radioisótopo, é administrado a um indivíduo, de preferência na corrente sanguínea e a presença e localização da proteína rotulada no hospedeiro são avaliadas. Essa técnica de formação de imagem é útil na classificação e tratamento de malignidades. A proteína pode ser rotulada com qualquer porção que é detectável em um hospedeiro, seja através de ressonância magnética nuclear, radiologia ou outro meio de detecção conhecido na técnica.

As proteínas da invenção também são úteis como agentes de purificação por afinidade. Nesse processo, os anticorpos são imobilizados sobre um suporte adequado, tal como uma resina Sephadex ou papel filtro, usando métodos bem-conhecidos na técnica.

As proteínas da invenção são também úteis como reagentes em pesquisa biológica, baseado em sua inibição da função de IGF-IR em célu-

las.

As proteínas da invenção podem ser empregadas em qualquer método de ensaio conhecido, tal como ensaios de ligação competitiva, ensaios em sanduíche diretos e indiretos e ensaios de imunoprecipitação (Zola, 5 Monoclonal Antibodies: A Manual of Techniques, páginas 147-158 (CRC Press, Inc., 1987)).

Agentes adicionais que podem ser usados com modalidades apropriadas da invenção

Em outros tratamentos terapêuticos ou composições, as proteínas 10 nas da invenção são co-administradas ou administradas sequencialmente, com um ou mais agentes terapêuticos adicionais. Agentes terapêuticos adequados incluem, mas não estão limitados a, produtos terapêuticos objetivado, outros produtos biológicos objetivados e agentes citotóxicos ou citostáticos. Em alguns casos, será preferido administrar agentes do mesmo ou de 15 um frasco, seringa ou outro dispositivo de administração terapeuticamente aceitável separado, que contém uma formulação líquida.

Determinados agentes terapêuticos para o câncer são aqueles agentes que buscam matar ou limitar o crescimento de células cancerígenas, ao mesmo tempo em que mantêm efeitos mínimos sobre o paciente. 20 Assim, tais agentes podem explorar qualquer diferença nas propriedades das células cancerígenas (por exemplo, metabolismo, vascularização ou apresentação de antígeno na superfície celular) a partir de células hospedeiras saudáveis. Diferenças na morfologia de tumor são locais potenciais para intervenção; por exemplo, o segundo produto terapêutico pode ser um anti- 25 corpo, tal como um anticorpo anti-VEGF, que é útil no retardo da vascularização do interior de um tumor sólido, desse modo, diminuindo sua taxa de crescimento. Outros agentes terapêuticos incluem, mas não estão limitados a, adjuntos, tais como HCl de granisetron, inibidores de androgênio, tal como acetato de leuprolida, antibióticos, tal como doxorubicina, antiestrogênios, 30 tal como tamoxifeno, antimetabólitos, tal como interferon alfa-2a, agentes citotóxicos, tal como taxol, inibidores enzimáticos, tal como inibidor de farnesil-transferase ras, imunomoduladores, tal como aldesleucina e derivados de

mostarda de nitrogênio, tal como HCl de mephalan e similares.

Os agentes terapêuticos que podem ser combinados com proteínas da invenção para eficácia anticâncer aperfeiçoada incluem diversos agentes usados na prática de oncologia (Referência: Cancer, Principles & Practice of Oncology, DeVita, V. T., Hellman, S., Rosenberg, S. A., 6ª edição, Lippincott-Raven, Filadélfia, 2001), tais como docetaxel, paclitaxel, doxorrubicina, epirubicina, ciclofosfamida, trastuzumab, capecitabina, tamoxifeno, toremifeno, letrozola, anastrozola, fulvestrant, exemestano, goserelina, oxaliplatina, carboplatina, cisplatina, dexametasona, antida, bevacizumab, 5-fluorouracila, leucovorina, levamisola, irinotecan, etoposídeo, topotecan, gemcitabina, vinorelbina, estramustina, mitoxantrona, abarelix, zoledronato, estreptozocina, rituximab, idarubicina, busulfan, clorambucila, fludarabina, imatinib, citarabina, ibritumomab, tositumomab, interferon alfa-2b, melphalam, bortezomib, altretamina, asparaginase, gefitinib, erlonitib, anticorpo antirreceptor de EGF (por exemplo, cetuximab ou panitumumab), ixabepilona e uma epotilona ou derivado dos mesmos e conjugados de fármacos citotóxicos e anticorpos contra receptores na superfície celular. Agentes terapêuticos preferidos são agentes de platina (tais como carboplatina, oxaliplatina, cisplatina), taxanos (tais como paclitaxel, docetaxel), gemcitabina e camptotecina.

O um ou mais agentes terapêuticos adicionais podem ser administrados antes, concorrentemente ou após o anticorpo, fragmento de anticorpo ou conjugado da invenção. Aqueles versados na técnica compreenderão que, para cada agente terapêutico, pode ser vantajoso a ordem particular de administração. Similarmente, aqueles versados na técnica compreenderão que, para cada agente terapêutico, a extensão de tempo entre a qual o anticorpo e um anticorpo, fragmento de anticorpo ou conjugado da invenção são administrados, variará.

Formulação e Administração

Formulações terapêuticas da invenção são preparadas para armazenamento através de mistura das proteínas descritas tendo o grau desejado de pureza com veículos, excipientes ou estabilizantes fisiologicamente

aceitáveis opcionais (Remington's Pharmaceutical Sciences 16ª edição, O-sol, A. Ed. (1980)), na forma de soluções aquosas, liofilizadas ou outras formulações. Veículos, excipientes ou estabilizantes aceitáveis são não-tóxicos para os recipientes nas dosagens e concentrações empregadas e incluem

5 tampões, tais como fosfato, citrato e outros ácidos orgânicos; antioxidantes, incluindo ácido ascórbico e metionina; conservantes (tais como cloreto de octadecildimetilbenzil amônio; cloreto de hexametônio; cloreto de benzalcônio; cloreto de benzetônio; fenol, butila ou álcool benzílico; alquil parabenos, tais como metil ou propil parabenos; catecol; resorcinol; ciclo-hexanol; 3-

10 pentanol; e m-cresol); polipeptídeos de baixo peso molecular (menos de cerca de 10 resíduos); proteínas, tais como albumina de soro, gelatina ou imunoglobulinas; polímeros hidrofílicos, tal como polivinilpirrolidona; aminoácidos, tais como glicina, glutamina, asparagina, histidina, arginina ou lisina; monossacarídeos, dissacarídeos e outros carboidratos, incluindo glicose,

15 manose ou dextranas; agentes de quelação, tal como EDTA; açúcares tais como sacarose, manitol, trealose ou sorbitol; contraíons de formação de sal, tal como sódio; complexos de metal (por exemplo, complexos de Zn-proteína); e/ou tensoativos não-iônicos, tais como TWEEN™, PLURO-NICS™ ou polietileno glicol (PEG).

20 As formulações aqui também podem conter mais de um composto ativo, conforme necessário, para a indicação que está sendo tratada em particular, de preferência aqueles com atividades complementares que não afetam adversamente uns aos outros. Exemplos de combinações de compostos ativos são fornecidos aqui. Tais moléculas estão, adequadamente,

25 presentes em combinação em quantidades que são eficazes para a finalidade pretendida.

Os ingredientes ativos podem também estar encerrados em uma microcápsula preparada, por exemplo, através de técnicas de coacervação ou através de polimerização interfacial, por exemplo, hidroximetil celulose ou

30 microcápsula de gelatina e microcápsula de (poli)metil metacrilato, respectivamente, em sistemas de distribuição de fármaco coloidais (por exemplo, lipossomas, microesferas de albumina, microemulsões, nanopartículas e na-

nocápsulas) ou em macroemulsões. Tais técnicas são descritas em Remington's Pharmaceutical Sciences 16ª edição, Osol, A. Ed. (1980).

As formulações a serem usadas para administração *in vivo* devem ser estéreis. Isso é prontamente obtido por meio de filtração através de membranas de filtração estéreis.

Preparados com liberação sustentada podem ser feitos. Exemplos adequados de preparados com liberação sustentada incluem matrizes semipermeáveis de polímeros hidrofóbicos sólidos contendo as proteínas da invenção, matrizes as quais estão na forma de artigos formatados, por exemplo, filmes ou microcápsula. Exemplos de matrizes com liberação sustentada incluem poliésteres, hidrogéis (por exemplo, (poli)2-hidroxietil metacrilato ou álcool (poli)vinílico. Polilactídeos (Patente U.S. No. 3.773.919), copolímeros de ácido L-glutâmico e etil-L-glutamato, acetato de etileno-vinila não-degradável, copolímeros de ácido glicólico-ácido láctico degradáveis, tal como o LUPRON DEPOT™ (microesferas injetáveis compostas de copolímero de ácido glicólico-ácido láctico e acetato de leuprolida) e ácido poli-D-(-)-3-hidroxibutírico. Embora polímeros, tais como acetato de etileno-vinila e ácido láctico-ácido glicólico, possam permitir a liberação de moléculas durante mais de 100 dias, determinados hidrogéis liberam proteína durante períodos de tempo mais curtos. Quando encapsuladas, as proteínas da invenção podem permanecer no corpo durante um longo período, elas podem desnaturar ou agregar como um resultado de exposição à umidade a 37 °C, resultando em uma perda de atividade biológica e possíveis alterações na imunogenicidade. Estratégias racionais podem ser aconselhadas para estabilização, dependendo do mecanismo envolvido. Por exemplo, se o mecanismo de agregação é descoberto como sendo formação de ligação S-S intermolecular através de intertroca de tio-dissulfeto, a estabilização pode ser obtida através de modificação de resíduos de sulfidril, liofilização a partir de soluções ácidas, controle do teor de umidade, uso de aditivos apropriados e desenvolvimento de composições de matriz polimérica específica.

Embora aqueles versados na técnica compreendam que a dosagem de cada agente terapêutico será dependente da identidade do agente,

as dosagens preferidas podem oscilar de cerca de 10 mg/metro quadrado a cerca de 2000 mg/metro quadrado, mais preferivelmente de cerca de 50 mg/metro quadrado a cerca de 1000 mg/metro quadrado. Para agentes preferidos, tais como agentes de platina (carboplatina, oxaliplatina, cisplatina), a dosagem preferida é cerca de 10 mg/metro quadrado a cerca de 400 mg/metro quadrado, para taxanos (paclitaxel, docetaxel), a dosagem preferida é cerca de 20 mg/metro quadrado a cerca de 150 mg/metro quadrado, para gemcitabina, a dosagem preferida é cerca de 100 mg/metro quadrado a cerca de 2000 mg/metro quadrado e, para camptotecina, a dosagem preferida é cerca de 50 mg/metro quadrado a cerca de 350 mg/metro quadrado. A dosagem desses e outros agentes terapêuticos pode depender se o anticorpo, fragmento de anticorpo ou conjugado da invenção é administrado concorrente ou sequencialmente com um agente terapêutico.

Para aplicações terapêuticas, as proteínas ou conjugados da invenção são administrados a um indivíduo, em uma forma de dosagem farmacologicamente aceitável. Elas podem ser administradas intravenosamente como um bolo ou através de infusão contínua durante um período de tempo, através das vias intramuscular, subcutânea, intra-articular, intrassinovial, intratecal, oral, tópica ou inalação. A proteína também pode ser administrada através das vias intratumoral, peritumoral, intralesional ou perilesional, para exercer efeitos terapêuticos sistêmicos, bem como terapêuticos. Veículos, diluentes e excipientes farmacologicamente aceitáveis adequados são bem conhecidos e podem ser determinados por aqueles versados na técnica conforme a situação clínica requeira. Exemplos de veículos, diluentes e/ou excipientes adequados incluem: (1) solução salina tamponada com fosfato de Dulbecco, pH de cerca de 7,4 contendo cerca de 1 mg/ml a 25 mg/ml de albumina de soro humano, (2) solução salina a 0,9% (NaCl a 0,9% peso/v) e (3) dextrose a 5% (peso/v). O método da presente invenção pode ser praticado *in vitro*, *in vivo* ou *ex vivo*.

Administração de uma proteína da invenção e um ou mais agentes terapêuticos adicionais, seja co-administrada ou administrada sequencialmente, pode ocorrer conforme descrito acima para aplicações terapêuticas.

Veículos, diluentes e excipientes farmacêuticamente aceitáveis adequados para co-administração serão compreendidos por aqueles versados na técnica como dependendo da identidade do agente terapêutico que está sendo co-administrado em particular.

5 Quando presente em uma forma de dosagem aquosa, ao invés de ser liofilizada, a proteína será, tipicamente, formulada em uma concentração de cerca de 0,1 mg/ml a 100 mg/ml, embora ampla variação fora dessas faixas seja permitida. Para o tratamento de doenças, a dosagem apropriada de anticorpo ou conjugado dependerá do tipo de doença a ser tratada, conforme definido acima, da gravidade e curso da doença, se os anticorpos são
10 administrados para fins preventivos ou terapêuticos, o curso de terapia anterior, história clínica do paciente e resposta ao anticorpo e o critério do médico que faz o atendimento. A proteína é, adequadamente, administrada ao paciente em uma vez ou durante uma série de tratamentos.

15 Dependendo do tipo e gravidade da doença, de preferência de cerca de 1 mg/metro quadrado a cerca de 2000 mg/metro quadrado de proteína é uma dosagem candidata inicial para administração ao paciente, mais preferivelmente de cerca de 10 mg/metro quadrado a cerca de 1000 mg/metro quadrado de anticorpo se, por exemplo, através de uma ou mais
20 administrações distintas ou através de infusão contínua. Para administrações repetidas durante vários dias ou mais, dependendo da condição, o tratamento é repetido até que uma supressão desejada dos sintomas da doença ocorra. Contudo, outros regimes de dosagem podem ser úteis e não são excluídos.

25 A presente invenção também inclui kits compreendendo um ou mais dos elementos descritos aqui e instruções para uso desses elementos. Em uma modalidade preferida, um kit da presente invenção inclui anticorpo, fragmento de anticorpo ou conjugado da invenção e um agente terapêutico. As instruções para essa modalidade preferida incluem instruções para inibi-
30 ção do crescimento de uma célula cancerígena usando a proteína da invenção e o agente terapêutico e/ou instruções para um método de tratamento de um paciente tendo um câncer usando o anticorpo, fragmento de anticorpo

ou conjugado da invenção e o agente terapêutico.

De preferência, o agente terapêutico usado no kit é selecionado do grupo consistindo em docetaxel, paclitaxel, doxorrubicina, epirubicina, ciclofosfamida, trastuzumab, capecitabina, tamoxifeno, toremifeno, letrozola, anastrozola, fulvestrant, exemestano, goserelina, oxaliplatina, carboplatina, cisplatina, dexametasona, antida, bevacizumab, 5-fluorouracila, leucovorina, levamisola, irinotecan, etoposídeo, topotecan, gemcitabina, vinorelbina, estramustina, mitoxantrona, abarelix, zoledronato, estreptozocina, rituximab, idarubicina, busulfan, clorambucila, fludarabina, imatinib, citarabina, ibritumomab, tositumomab, interferon alfa-2b, melphalam, bortezomib, altretamina, asparaginase, gefitinib, erionitib, anticorpo antirreceptor de EGF (por exemplo, cetuximab ou panitumumab), ixabepilona e uma epotilona ou derivado da mesma. Mais preferivelmente, o agente terapêutico é um agente de platina (tal como carboplatina, oxaliplatina, cisplatina), um taxano (tal como paclitaxel, docetaxel), gemcitabina ou camptotecina.

Os elementos dos kits da presente invenção estão em uma forma adequada para um kit, tal como uma solução ou pó liofilizado. A concentração ou quantidade dos elementos dos kits será compreendida, por aqueles versados na técnica como variável, dependendo da identidade e uso pretendido de cada elemento do kit.

Os cânceres e células mencionados nas instruções dos kits incluem câncer de mama, câncer de cólon, carcinoma ovariano, osteossarcoma, câncer cervical, câncer de próstata, câncer de pulmão, carcinoma sinovial, câncer pancreático, melanoma, mieloma múltiplo, neuroblastoma e rhabdomiosarcoma.

Referências de Patente Adicionais

Os métodos e composições descritos nos seguintes Pedidos de Patente e Patentes adicionais também são incluídos na presente descrição:

Publicações de Patente U.S. Nos. 20050186203; 20050084906; 20050008642; 20040202655; 20040132028; 20030211078; 20060083683; 20060099205; 20060228355; 20040081648; 20040081647; 20050074865; 20040259155; 20050038229; 20050255548; 20060246059; e Patentes U.S.

Nos. 5.707.632; 6.818.418; e 7.115.396; e Publicações PCT Nos. WO2005/085430; WO2004/019878; WO2004/029224; WO2005/056764; WO2001/064942; e WO2002/032925. O presente pedido reivindica prioridade aos Pedidos Provisórios U.S. Nos. 60/860.605 e 60/879.666, depositados em 22 de Novembro de 2006 e 9 de Janeiro de 2007, respectivamente, os conteúdos dos quais são incorporados por referência em sua totalidade.

Incorporação por Referência

Todos os documentos e referências, incluindo documentos de patente e websites descritos aqui, são individualmente incorporados por referência ao presente documento até o mesmo ponto como se fossem escritos nesse documento, no todo ou em parte.

EXEMPLOS

A invenção será agora descrita através de referência aos exemplos a seguir, os quais são ilustrativos apenas e não se destinam a limitar a presente invenção. Embora a invenção tenha sido descrita em detalhes e com referência à modalidades específicas da mesma, será evidente para aqueles versados na técnica que várias alterações e modificações podem ser feitas na mesma sem se desviar do espírito e escopo da mesma.

Exemplo 1: Identificação inicial de moléculas de ligação ao IGF-IR

Uma biblioteca de aproximadamente 10^{13} variantes de fusão de RNA-proteína foi construída baseado sobre a armação do décimo domínio do tipo 3 de fibronectina humana com três regiões randomizadas nas posições 23-29, 52-55 e 77-86 (os números de aminoácido são com referência à SEQ ID NO: 1) (biblioteca com três alças; Xu e outros, Chemistry & Biology 9: 933-942, 2002). Após conversão à heteroduplas de mRNA/cDNA, a biblioteca de um trilhão de fusões de mRNA/cDNA foi ligada ao IGF-IR biotinilado a 100 nM em solução e capturada sobre glóbulos magnéticos revestidos com estreptavidina. O cDNA foi eluído, amplificado através de PCR e usado para gerar uma nova biblioteca de fusões de mRNA/cDNA-proteína. Cinco ciclos de seleção foram realizados dessa maneira e o percentual de bibliotecas que se ligam ao IGF-IR foi monitorado através de PCR quantitativa após cada ciclo para identificar o enriquecimento de ligação ao alvo (Figura 1).

Exemplo 2: Identificação de clones de IGF-IR competitivos

As proteínas codificadas por clones independentes foram analisadas com relação à inibição de ligação ao alvo na presença de IGF-IR usando um ensaio de ligação competitiva. Mais de cem clones foram identifi-

5 cados que inibiram a ligação de IGF-I ao IGF-IR, sugerindo que esses clones se ligam ao IGF-IR em ou próximo do sítio de ligação de ligante natural (IGF-I). As SEQ ID NOs (vide Figura 30) desses cem clones e sua inibição percentual no ensaio de ligação competitiva são apresentadas na Tabela 1.

Tabela 1. SEQ ID NOs de clones competitivos de IGF-IR e inibição %					
Clone	SEQ ID NO:	Inibição %	Clone	SEQ ID NO:	Inibição %
223B02	2	89,1%	224D01	56	62,3%
223A04	3	87,0%	225D09	57	61,8%
223F03	4	86,8%	218H08	58	61,6%
214D04	5	86,5%	225C05	59	61,1%
225E09	6	84,6%	224B02	60	60,2%
224A02	7	84,6%	214F04	61	59,6%
223A07	8	83,8%	225H10	62	58,4%
223E11	9	82,2%	215G10	63	58,2%
223H04	10	82,2%	225G09	64	58,1%
215G06	11	80,5%	223A09	65	58,0%
219F08	12	80,0%	225A10	66	58,0%
223B01	13	79,7%	215G07	67	58,0%
225B01	14	79,4%	215H06	68	57,6%
214C11	15	78,9%	215G01	69	57,4%
219C07	16	78,8%	225D11	70	57,3%
218C04	17	77,0%	225H09	71	56,8%
215A07	18	76,1%	215H03	72	56,4%
223D01	19	76,0%	218F11	73	56,4%
225D03	20	74,8%	225G07	74	56,1%
225A02	21	74,6%	225E05	75	55,7%
223A10	22	73,7%	218G01	76	54,3%

Tabela 1. SEQ ID NOs de clones competitivos de IGF-IR e inibição %					
Clone	SEQ ID NO:	Inibição %	Clone	SEQ ID NO:	Inibição %
225B03	23	73,7%	224F01	77	53,6%
218C05	24	73,6%	225F05	78	53,0%
225A05	25	72,1%	219C04	79	52,5%
224A01	26	72,0%	215F02	80	50,7%
214F03	27	72,0%	223B05	81	50,6%
214A08	28	70,6%	214G08	82	50,5%
223H11	29	70,5%	219F03	83	50,3%
218B03	30	70,4%	214H01	84	50,0%
215E09	31	70,3%	215A03	85	49,7%
223A11	32	70,2%	214C08	86	49,6%
215H07	33	70,0%	214E04	87	49,2%
219G02	34	69,8%	219F07	88	49,1%
224F02	35	69,6%	215A05	89	49,0%
225A07	36	68,9%	214B07	90	48,7%
225B08	37	68,9%	214B10	91	48,5%
215E10	38	68,8%	215F10	92	48,1%
225B11	39	68,6%	215D01	93	47,9%
214C04	40	68,5%	223C04	94	46,8%
218F01	41	68,3%	219A09	95	46,7%
225H01	42	67,1%	219C11	96	46,6%
215D11	43	67,1%	215C05	97	46,6%
219H07	44	66,3%	215E11	98	46,3%
225A06	45	65,9%	225C03	99	45,9%
218A10	46	65,7%	219A06	100	45,9%
225H08	47	65,7%	215B03	101	45,7%
214B04	48	65,6%	215H09	102	45,7%
218F04	49	65,2%	219G08	103	45,4%
225A09	50	65,0%	225C06	104	45,3%
223G04	51	64,2%	215E01	105	45,3%

Tabela 1. SEQ ID NOs de clones competitivos de IGF-IR e inibição %					
Clone	SEQ ID NO:	Inibição %	Clone	SEQ ID NO:	Inibição %
224H03	52	63,7%	219G10	106	44,9%
215G08	53	63,6%	219A11	107	44,7%
218B06	54	62,7%	215F05	108	44,7%
224D05	55	62,5%	219F04	109	44,3%

Exemplo 3: Exame das propriedades eletroforéticas de clones competitivos de IGF-IR

A pureza e propriedades eletroforéticas de clones selecionados foram examinadas através de SDS-PAGE (Figura 2). Descobriu-se que esses eram razoavelmente puros, considerando-se sua purificação em uma única coluna e tinham pesos moleculares aparentes consistentes com suas massas teóricas (levando-se em conta a massa adicional associada às tags C-terminais).

Exemplo 4: Identificação de famílias de sequência que se ligam ao IGF-IR

Clones que foram capazes de competir com o IGF-I foram sequenciados e alinhados usando Vector NTI (Invitrogen). A maioria dos clones caiu em três famílias distintas. Uma família foi reconhecida por uma valina conservada na posição 6 da alça BC e alças FG de comprimento variável contendo uma arginina e tirosina conservadas (Clones 218C04, 215D09, 214C04, 214F03, 214C03, 214E01 e 218F09). Uma segunda família foi reconhecida por uma tirosina e prolina conservadas na alça DE e estava, usualmente, associada a uma alça FG de exatamente 10 aminoácidos Clones 225D03, 215E09, 215B07, 215D11, 218E09, 309B01, 310A01 e 310A03). Uma terceira família de clones tinha uma alça FG de 14 aminoácidos com aminoácidos hidrofóbicos conservados (Clones 223B01, 223B02 e 218F08). Os clones restantes não mostraram similaridade às outras famílias, não podendo ser agrupados em famílias distintas e não são mostrados.

Exemplo 5: Identificação de um clone candidato adequado para otimização

Os clones resultantes do processo de seleção acima provavel-

mente não vão de encontro aos requisitos de afinidade estrigente, especificidade e biofísicos de um produto bioterapêutico e, portanto, requerem mutagênese adicional, em que as alças de ligação são refinadas ou "otimizadas". De forma a identificar os clones mais distantes ao longo dessa trajetória, um número selecionado de candidatos foi submetido à caracterização profunda. Nesse exemplo, a caracterização de um clone competitivo de IGF-IR, 218C04, é descrita.

Um litro de caldo de *E. coli* foi preparado e o clone 218C04 foi purificado, conforme indicado, através de SDS PAGE (Figura 3). Em um exame das propriedades biofísicas, 218C04 era virtualmente totalmente monomérico, conforme refletido através de SEC (Figura 4), sugerindo que esse clone não tem uma propensão de produzir agregados estáveis em maiores concentrações de proteína. Análise por ressonância de plasmônio em superfície (BIAcore) do produto purificado revelou que o clone injetado na fase em solução se liga ao IGF-IR imobilizado com uma K_D de 1,8 nM. Coletivamente, essas propriedades indicaram que esse clone era adequado para otimização.

Exemplo 6: Otimização de um clone IGF-IR-específico

No exemplo a seguir, a otimização de um clone IGF-IR-específico, 218C04, é descrita.

A sequência do clone 218C04 com as alças BC, DE e FG, respectivamente, sublinhados é mostrada:

VSDVPRDLEVVAATPTSL^{BC}LISWSPYLRVARYYYRITYGETGGNSPVQEFTVPS
SARTATISGLKPGVDYTITVYAVTPSNIIGRHYPISINYRT (SEQ ID NO: 17)

Três bibliotecas foram construídas, nas quais uma alça de cada vez foi substituído por uma sequência aleatória. As bibliotecas foram construídas a nível de DNA, conforme exemplificado abaixo, exceto que sequências aleatórias em duas de três alças foram substituídas pela sequência fixa correspondendo ao clone 218C04.

A amplificação, síntese de fusões de mRNA-proteína e seleção por afinidade foram realizadas com essas três bibliotecas. Os percentuais de ligação foram monitorados em cada ciclo (Figura 5a) e PROfusion™ foi con-

tinuado até que cada biblioteca mostrasse ligação acima de 1%. Nesse ponto, as alças aleatórios foram amplificados de cada biblioteca e remontados para fazer uma biblioteca mestre na qual todos as 3 alças tinham sido otimizadas (Figura 5b).

- 5 A biblioteca mestre contendo todos os 3 alças otimizados foi levada a ciclos de amplificação, síntese de fusões de mRNA-proteína e seleções por afinidade. IGF-IR foi usado em concentrações decrescentes para selecionar os ligantes com maior afinidade (Figura 5c).

10 **Exemplo 7: Ensaio competitivo de IGF-IR para avaliar clones derivados otimizados**

- Proteínas de armação baseadas em fibronectina otimizadas selecionadas foram comparadas com um clone pré-otimizado, clone 218C04 nesse exemplo, com relação à sua capacidade de inibir a interação entre IGF-I e IGF-IR, em um ensaio competitivo. Após HTPP e quantificação, muitos clones exibem inibição superior ao clone inicial, com IC50s na faixa de 15 baixo nM (Figura 6). Um clone em particular, 338A06, pareceu ter uma IC50 em ou abaixo de 1 nM nesse ensaio (Figura 6).

Exemplo 8: Sequências de clones competitivos de IGF-IR otimizados

- Após otimização de clones selecionados e avaliação de derivados com relação à inibição da interação de IGF-IGF-IR em um ensaio competitivo, os clones foram sequenciados. Vide SEQ ID NOs: 110-125 na Figura 20 30 e Tabela 2. Similar ao clone precursor 218C04 nesse exemplo, todos os clones derivados inibitórios continham um resíduo de valina conservado na alça BC. Além disso, um resíduo hidrofóbico conservado, tipicamente leucina, também foi frequentemente observado em uma posição conservada 25 na alça BC.

- As alças FG de clones otimizados também compartilhavam resíduos conservados com o clone precursor 218C04 em posições específicas, a despeito de variações no comprimento da alça. Para essa família de clones em particular, o motivo arginina-X-tirosina parece ser um motivo importante 30 requerido para funcionalidade. Isso é encontrado em todos, exceto um clone derivado e, nesse clone (354C10, arginina-X-valina), parecer haver

uma substituição conservativa tolerada. Portanto, para a família 218C04 de clones, parece haver quatro posições dominantes, duas na alça BC e duas na alça FG, que parecem exercer o maior papel na definição de ligação ao IGF-IR e atividade inibitória.

5 Tabela 2

Clone	SEQ ID NO:	Clone	SEQ ID NO:	Clone	SEQ ID NO:
338A05	110	354A09	115	354D10	120
338A06	111	354A10	116	354E02	121
339A01	112	354B10	117	354F11	122
353F10	113	354C05	118	354F06	123
353H09	114	354C10	119	354G02	124
				354G09	125

Exemplo 9: Exame das propriedades eletroforéticas de clones competitivos de IGF-IR otimizados

Um litro de caldo de *E. coli* de clones otimizados selecionados foi preparado e as proteínas foram purificadas. SDS PAGE (Figura 7) revelou boa pureza, a despeito de purificações em uma única coluna e pesos moleculares aparentes para os clones consistentes com seus pesos moleculares teóricos (permitindo tags).

Exemplo 10: Exame da estabilidade térmica de clones competitivos de IGF-IR otimizados

Um litro de caldo de *E. coli* de clones de IGF-IR otimizados selecionados foi preparado e as proteínas foram purificadas. Calorimetria por exploração diferencial (DSC) foi realizada para caracterizar a energia de desdobramento ou temperatura de fusão, T_f , de clones individuais. O clone 338A06 exibiu uma temperatura de desdobramento de 62 °C (Figura 8), indicando uma estrutura altamente estável. As temperaturas de fusão de clones otimizados adicionais são encontradas na Tabela 3.

Tabela 3. Temperaturas de fusão de clones de IGF-IR determinadas através de calorimetria por exploração diferencial

Clone	(Tf, °C)
338A05	68
353F10	59
353H09	55
354A10	46
368G05	56
375G10	59

Exemplo 11: Exame das propriedades em solução de clones competitivos de IGF-IR otimizados

Um litro de caldo de *E. coli* de clones otimizados foi preparado e as proteínas foram purificadas. Cromatografia por exclusão de tamanho (SEC) revelou comportamento monomérico, nesse exemplo, para o clone 338A06 (Figura 9), indicando que, em maior concentração de proteína, os clones otimizados não têm uma tendência de agregar. A monomericidade foi confirmada usando SEC combinada com Dispersão de Luz a Laser Multiângulo (MALLS). Dispersão de luz "clássica" (também conhecida como dispersão "estática" ou de "Rayleigh" ou MALLS) proporciona uma medição direta da massa molecular. Portanto, ela é muito útil para determinar se o estado nativo de uma proteína é um monômero ou um oligômero superior e para medição das massas de agregados ou outras espécies não-nativas. No presente exemplo, a análise do clone 388A10 é apresentada. Conforme mostrado na Figura 10, SEC MALLS determinou uma massa de 12.190 Da para o clone 338A06 que está bem dentro do erro experimental para a massa prevista de 11.740 para o monômero marcado com His. Isso fornece evidência adicional de que os clones se comportam bem como monômeros em solução.

Exemplo 12: Determinação da afinidade de ligação e cinética de clones competitivos de IGF-IR otimizados

Um litro de caldo de *E. coli* de clones otimizados selecionados

foi preparado e as proteínas foram purificadas. Análise por ressonância e plasmônio em superfície (BIAcore) foi realizada usando clones em fase em solução e de IGF-IR imobilizados recombinantes de forma a determinar a cinética de ligação e afinidades de ligação. Conforme mostrado na Tabela 4, as afinidades de ligação oscilavam de K_D s com pM com dígito duplo a nM com único dígito para os clones mostrados no presente exemplo. As taxas de desativação estavam na faixa de 10^{-4} (1/s) e as taxas de ativação eram muito rápidas, tipicamente de $\sim 10^{+6}$ (1/Ms).

Tabela 4. Determinação de k_a , k_d e K_D através de BIAcore

Clone	K_a (1/M.s)x 10^{+6}	K_d (1/s)x 10^{-4}	KD (nM)
353F10	3,7	2,1	0,056
353H09	3,8	2,2	0,057
338A06	2,2	4,3	0,069
354A10	1,1	1,8	0,158
338A05	1,3	3,3	0,261
375G10	1,3	7,0	0,538
339A01	1,2	6,7	0,565
368G05	0,0036	9,8	2,740

Exemplo 13: Determinação de ligação de clones competitivos de IGF-IR otimizados ao receptor de insulina

Um litro de caldos de *E. coli* de clones otimizados selecionados foi preparado e as proteínas foram purificadas. A homologia do IGF-IR humano pelo receptor de insulina é de aproximadamente 56%. Para assegurar que os clones competitivos de IGF-IR são, na verdade, específicos para o IGF-IR, eles foram avaliados em alta concentração contra o receptor de insulina humano usando a metodologia BIAcore. O receptor de insulina humano foi imobilizado sobre um chip BIAcore, assim como uma proteína irrelevante de controle de ligação não-específica. Os clones foram passados sobre o chip a 10 μ M, uma concentração a qual é mais de 10.000 vezes maior do que a K_D de ligação do IGF-IR pela maioria dos clones. O percentual de sinal para ligação à insulina em uma concentração similar foi registrado e é apresentado na Tabela 5. A maioria dos clones não exibiu ou exibiu ligação

raramente detectável ao receptor de insulina nessa alta concentração, ilustrando que, na verdade, eles são específicos ao IGF-IR. Os clones exibindo algum grau de ligação ao receptor de insulina parecem ser ligantes seletivos.

Tabela 5. Ligação ao receptor de insulina (IR) pelos clones de IGF-IR

Clone	Ligação % ao IR a 10 μ M
338A06	2
354A10	1
353F10	1
353H09	0
375G10	0
368G05	21
338A05	45
339 A01	>100
Insulina	100

Exemplo 14: Espectrometria de massa por MALDI TOF do clone de IGF-IR 338A06

Espectrometria de massa dos clones de IGF-IR otimizados purificados foi realizada para assegurar a identidade. No presente exemplo, o clone 338A06 foi examinado. A massa prevista do clone 338A06 é de 11741 unidades de massa atômica (amu). Espectrometria de massa por MALDI TOF do clone 338A06 revelou uma massa de 11741 m/z após calibração com padrões (Figura 11). Espécies diversas adicionais com maior m/z são observadas, contudo, essas são consistentes com os adutos de matriz (Figura 11). Portanto, o 338A06 e, na verdade, todos os clones de IGF-IR examinados, proporcionaram massas consistentes com suas massas previstas.

Exemplo 15: Atividade do clone competitivo de IGF-IR 338A06 em ensaios baseados em célula

Os clones de IGF-IR otimizados purificados foram avaliados em ensaios baseados em célula de forma a confirmar a atividade. Em um exemplo, a inibição de mitogênese IGF-I-mediada por um clone selecionado, 338A06, é demonstrada, conforme mostrado na Figura 12. A linhagem de

adenocarcinoma pancreático humano BxPC-3 em meio isento de IGF-I foi tratada com uma série de diluições de clone 339A06 ou um anticorpo monoclonal anti-IGF-IR comumente usado (MAB391). Após uma exposição estimulatória de 24 horas ao IGF-I, as células foram tratadas com ^3H -timidina para medir a proliferação celular. Conforme mostrado na Figura 12, o clone 338A06 inibiu a proliferação IGF-I-dependente comparável ao anticorpo monoclonal de controle, com uma IC50 de aproximadamente 10-20 nM.

Em um segundo ensaio baseado em célula, a inibição de ligação a IGF-I radiorrotulado em uma linhagem de célula cancerígena expressando IGF-IR pelo clone 338A06 é demonstrada. Células MCF-7 de adenocarcinoma de mama humano foram pré-incubadas durante 30 minutos com o clone 338A06, anticorpo monoclonal MAB391 ou IGF-I não-rotulado. Após o período de incubação, IGF-I radiorrotulado foi adicionado. As células foram subsequentemente submetidas à lise e a radioatividade foi quantificada. Conforme mostrado na Figura 13, o clone 338A06 e IGF-I gelado tinham IC50s essencialmente comparáveis de aproximadamente 1-2 nM, enquanto que o anticorpo monoclonal parecia ser menos potente, com uma IC50 de aproximadamente 5 nM.

Exemplo 16: Otimização do clone 338A06

Um dos processos de degradação comumente observados para proteínas durante armazenamento é a oxidação de resíduos de metionina, a qual pode resultar na perda potencial de estabilidade química e física e atividade biológica. Embora os clones de proteína de armação baseada em fibronectina não contenham resíduos de metionina em sua parte principal, um número selecionado de clones competitivos de IGF-IR contém metionina em seus alças. Otimização foi realizada de forma a selecionar clones os quais retinham as propriedades desejáveis de atividade biológica e propriedades biofísicas do clone inicial, mas substituindo o(s) resíduo(s) de metionina indesejável(is) nas alças. No presente exemplo, a otimização do clone 338A06, o qual contém um resíduo de metionina na alça FG, é mostrada.

O clone 338A06 foi otimizado usando uma única biblioteca com 6 aminoácidos aleatórios na alça FG. A sequência do 338A06 (SEQ ID NO:

111) foi incorporada nas alças BC e DE da nova biblioteca usando os oligonucleotídeos apropriados.

A biblioteca foi construída conforme descrito abaixo e DNA fita dupla foi convertido em fusões de mRNA-proteína para proporcionar cerca de 1000 cópias de cada sequência de alça FG. Ciclos de amplificação por PROfusion™, formação de fusão de mRNA-proteína e seleção por afinidade foram realizados. No primeiro ciclo, a concentração de IGF-IR biotilado foi de 100 nM, mas essa foi reduzida em ciclos subsequentes para enriquecer os ligantes de maior afinidade.

10 **Exemplo 17: Ensaio de ligação direta para derivados otimizados de 338A06**

Um ensaio de ligação direta foi usado para selecionar derivados otimizados do clone 338A06 por ligação intensificada ao IGF-IR. Clones que mostraram ligação em um ensaio de um único ponto foram ainda analisados usando um gradiente de concentrações de clone. Conforme mostrado na Figura 14, uma série de clones derivados se ligou ao IGF-IR com afinidades comparáveis ao clone precursor 338A06. A ligação meio-máxima foi observada em uma concentração de aproximadamente 1 nM (Figura 14).

20 **Exemplo 18: Sequências de clones competitivos de IGF-IR 338A06 otimizados**

Após otimização de alça FG do clone 338A06 e avaliação dos derivados com relação à ligação ao IGF-IR no ensaio de ligação direta, os clones foram sequenciados. Vide SEQ ID NOs: 184-202 da Figura 30 e Tabela 6. Dos clones apresentados nesse exemplo, apenas um clone contém metionina (clone 387A09) na alça FG e essa está em uma posição distinta do clone 338A06 precursor. Portanto, a metionina na alça FG do clone 338A06 não parece ser importante para funcionalidade. A presente invenção proporciona uma forma para manipular esse resíduo de desestabilização.

Consistente com a derivação de 218C04 desses clones, o motivo de arginina-X-tirosina é retido em todos os produtos do esforço de otimização da alça FG de 338A06. Isso proporciona evidencia adicional de que esses dois resíduos nesse registro parecem ser determinantes dominantes

na ligação e inibição de IGF-IR no contexto da duplicação de proteína de armação baseada em fibronectina para essa família em particular.

Tabela 6

Clone	SEQ ID NO:	Clone	SEQ ID NO:	Clone	SEQ ID NO:
385A08	184	385F08	190	386F10	196
385A09	185	385H06	191	386F11	197
385B04	186	386A03	192	386H05	198
385D05	187	386A05	193	387A03	199
385E01	188	386A07	194	387A09	200
385E04	189	386F01	195	387B01	201
				387C02	202

Exemplo 19: Exame das propriedades em solução dos clones competitivos de IGF-IR 338A06 otimizados com alça FG

Cromatografia por exclusão de tamanho (SEC) do material de HTPP para clones competitivos de IGF-IR 338A06 otimizados com alça FG revelou comportamento monomérico indicando que, em uma maior concentração de proteína, clones otimizados não têm uma tendência de agregar. Nove clones derivados da otimização e HTPP são apresentados nesse exemplo (Figura 15).

Exemplo 20: Determinação da afinidade de ligação e cinética de clones competitivos de IGF-IR 338A06 otimizados com alça FG

Um litro de caldo de *E. coli* de clones competitivos de IGF-IR 338A06 otimizados com alça FG foi preparado e as proteínas foram purificadas. Análise pelo BIAcore foi realizada usando clones em fase em solução e de IGF-IR imobilizados recombinantes de forma a determinar a cinética de ligação e afinidades de ligação. Conforme mostrado na Tabela 7, as afinidades de ligação oscilavam de K_D s com pM com dígito duplo a nM com único dígito para os clones mostrados no presente exemplo. As taxas de desativação estavam na faixa de 10^{-4} (1/s) e as taxas de ativação eram muito rápidas, tipicamente de $\sim 10^6$ (1/Ms).

Tabela 7. Determinação de k_a , k_d e K_D através de BIAcore

Clone	K_a (1/M.s)x 10^{+6}	K_d (1/s)x 10^{-4}	K_D (nM)
385A08	5,7	1,9	34
386A03	5,2	4,6	88
387B01	6,5	4,4	67
389A12	6,4	2,8	44
386F10	1,9	2,3	123

Exemplo 21: Determinação de ligação de clones competitivos de IGF-IR 338A06 otimizados com alça FG ao receptor de insulina

Um litro de caldo de *E. coli* de clones competitivos de IGF-IR 338A06 otimizados com alça FG selecionados foi preparado e as proteínas foram purificadas. A homologia do IGF-IR humano pelo receptor de insulina é de aproximadamente 56%. Para assegurar que os clones competitivos de IGF-IR são, na verdade, específicos para o IGF-IR, eles foram avaliados em alta concentração contra o receptor de insulina humano usando a metodologia BIAcore. O receptor de insulina humano foi imobilizado sobre um chip BIAcore, assim como uma proteína irrelevante de controle de ligação não-específica. Os clones foram passados sobre o chip a 10 μ M, uma concentração a qual é mais de 10.000 vezes maior do que a K_D de ligação do IGF-IR pela maioria dos clones. O percentual de sinal para ligação à insulina em uma concentração similar foi registrado e é apresentado na Tabela 8. A maioria dos clones não exibiu ou exibiu ligação raramente detectável ao receptor de insulina nessa alta concentração, ilustrando que, na verdade, eles são específicos ao IGF-IR.

Exemplo 22: Exame da estabilidade térmica de clones 338A06 otimizados com alça FG

Um litro de caldo de *E. coli* de clones de clones competitivos de IGF-IR 338A06 otimizados com alça FG selecionados foi preparado e as proteínas foram purificadas. Calorimetria por exploração diferencial (DSC) foi realizada para caracterizar a energia de desdobramento ou temperatura de fusão, T_f , de clones individuais. Os clones testados exibiram temperaturas

de desdobramento de 58-63 °C, indicando estruturas altamente estáveis. As temperaturas de fusão de clones otimizados são encontradas na Tabela 9.

Tabela 9. Temperaturas de fusão de clones de IGF-IR determinadas através de calorimetria por exploração diferencial

Clone	(Tf, °C)
385A08	59
386A03	62
386F10	58
387B01	63
389A12	58

Exemplo 23: Exame das propriedades em solução de clones competitivos de IGF-IR 338A06 otimizados com alça FG após purificação

5 Um litro de caldo de *E. coli* de clones competitivos de IGF-IR 338A06 otimizados com alça FG foi preparado e as proteínas foram purificadas. Cromatografia por exclusão de tamanho (SEC) do material de HTPP para os clones competitivos de IGF-IR 338A06 otimizados com alça FG revelou comportamento monomérico indicando que, em maiores concentra-

10 ções de proteína, clones otimizados não têm uma tendência de agregar. Nesse exemplo, o perfil por SEC de um clone representativo, 387B01, é apresentado (Figura 16).

Exemplo 24: Exame da pureza e homogeneidade de clones 338A06 otimizados com alça FG ao IGF-IR através de RP-HPLC após purificação

15 Um litro de caldo de *E. coli* de clones competitivos de IGF-IR 338A06 otimizados com alça FG foi preparado e as proteínas foram purificadas. cromatografia de líquido de alto desempenho de fase inversa (RP-HPLC) foi realizada para caracterizar a pureza dos clones, bem como estabelecer a homogeneidade do clone. Todos os clones exibiram excelente pu-

20 reza e homogeneidade após purificação em uma única coluna, que explora a tag C-terminal manipulada em seu C-término, conforme exemplificado pelo cromatograma representativo mostrado na Figura 17.

Exemplo 25: Espectrometria de massa por MALDI TOF de clones 338A06 otimizados com alça FG após purificação

Um litro de caldo de *E. coli* de clones competitivos 338A06 otimizados com alça FG foi preparado e as proteínas foram purificadas. Espectrometria de massa dos clones de IGF-IR otimizados purificados foi realizada para assegurar a identidade. No presente exemplo, o clone 387B01 foi examinado. A massa prevista do clone 387B01 é de 11554 unidades de massa atômica (amu). Espectrometria de massa por MALDI TOD do clone 387B01 revelou uma massa de 11553 m/z após calibração com padrões, bem dentro do erro experimental da instrumentação (Figura 18). Uma espécie diversa adicional em maior m/z é observada. Não se sabe se essa é um aduto de matriz ou uma espécie pós-traducionalmente modificada. Portanto, o 387B01 e, na verdade, todos os clones de IGF-IR examinados, proporcionaram massas consistentes com suas massas previstas.

Exemplo 26: PEGuilação de proteínas de armação baseada em fibronectina

De forma a realizar estudos *in vivo*, PEGuilação das proteínas de armação baseadas em fibronectina foi realizada. No presente exemplo, o clone 385A08 foi produzido em um sistema de expressão de *E. coli* com uma extensão C-terminal para proporcionar a seguinte sequência de proteína (extensão C-terminal em itálico em negrito, com Cys97 sublinhada):

GVSDVPRDLEVVAATPTSLLISWSARLKVARYYRITYGETGGNSPVQEFTV
PKNVYTATISGLKPGVDYTITVYAVTRFRDYQPISINYRTEIDKPCQ (SEQ ID NO: 203)

A única sulfidrila do resíduo de cisteína na posição 97 foi usada para acoplar variantes de PEG usando química de maleimida padrão para proporcionar duas formas PEGuiladas diferentes de 385A08. Um PEG bifuncional de 20 kDa linear e um PEG de 40 kDa ramificado não funcional (NOF Corporation) foram conjugados ao clone 385A08 para produzir 385A08-PEG20-385A08 e 385A08-PEG40, respectivamente. As formas de proteína PEGuiladas foram purificadas a partir da proteína não reagida e PEG através de cromatografia de troca de ânions e por exclusão de tamanho. Ligação covalente das duas formas de PEG de 385A08 foi verificada através de SDS-PAGE (Figura 11) e espectrometria de massa.

Exemplo 27: Determinação de afinidade de ligação e cinética de variantes de clone de armação baseada em fibronectina PEGuiladas

Análise por ressonância de plasmônio em superfície (BIAcore) foi realizada usando analito em fase em solução e IGF-IR imobilizado recombinante de forma a determinar a cinética de ligação e afinidades de ligação das variantes 385A08-PEG20-385A08 e 385A08-PEG40. Enquanto foi descoberto que a forma 385A08-PEG40 tem uma taxa de ativação aproximadamente 10 vezes mais lenta (k_a) com relação ao 385A08 não-modificado, a forma 385A08-PEG20-385A08 tem uma taxa de ativação aproximadamente duas vezes mais rápida (Tabela 10). As taxas de desativação (k_d ; Tabela 10) das variantes com relação ao 385A08 não-modificado estavam ligeiramente aumentadas para a forma 385A08-PEG40 e ligeiramente diminuídas para a variante 385A08-PEG20-385A08.

Tabela 10. Determinação de k_a , k_d e K_D através de BIAcore

Clone	K_a (1/M.s)x 10^{+6}	K_d (1/s)x 10^{-4}	K_D (nM)
385A08	6,9	1,6	23
385A08-PEG20-385A08	15	0,9	6
385A08-PEG40	0,6	2,1	355

Exemplo 28: Avaliação de variantes de clone de armação baseada em fibronectina PEGuiladas em um ensaio de proliferação de IGF-IR

As variantes de armação baseada de fibronectina PEGuiladas foram avaliadas com relação à inibição de proliferação mediada por soro usando a linhagem de célula de plasmacitoma humano NCI-H929. Nessa linhagem de célula, o MAB391 anti-IGF-IR e o 385A08 não-modificado demonstraram graus comparáveis de inibição de crescimento celular, com uma IC_{50} aparente de aproximadamente 100 pM. A variante 385A08-PEG40 era ligeiramente menos inibitória, com uma IC_{50} se aproximando de 1 nM. Por outro lado, a variante PEG20-385A08-PEG20 era extremamente potente e essencialmente 100% inibitória em todas as concentrações testadas. Portan-

to, a IC50 era de menos de 100 fM.

Exemplo 29: Avaliação de multímeros de ligantes de IGF-IR de armação de fibronectina em um ensaio de proliferação de IGF-IR

Uma linhagem de célula linfocítica de murino, 32D, expressando IGF-IR humano foi usada para avaliar os efeitos de antagonistas de IGF-IR. Antagonistas compreendendo dois domínios de ligação a IGF-IR de armação de fibronectina demonstraram um aumento acentuado nos efeitos inibitórios com relação a um único domínio de armação de fibronectina ou um anticorpo anti-IGF-IR.

Exemplo 30: Avaliação de multímeros de armação de fibronectina biespecíficos em um ensaio de proliferação de IGF-IR

Proteínas de armação de fibronectina foram avaliadas com relação à inibição de proliferação mediada por soro usando a linhagem de célula de plasmacitoma humano NCI-H929. Nessa linhagem de célula, a armação de fibronectina de IGF-IR e o multímero de armação de fibronectina biespecífico IGF-IR/VEGFR2 demonstraram graus comparáveis de inibição de crescimento celular.

Exemplo 31: Avaliação de multímeros de armação de fibronectina biespecíficos em um ensaio de proliferação de VEGFR2

Proteínas de armação de fibronectina foram avaliadas com relação à inibição de uma linhagem de célula VEGF-dependente. Nessa linhagem de célula, a armação de fibronectina de VEGFR2 e o multímero de armação de fibronectina biespecífico IGF-IR/VEGFR2 demonstraram graus comparáveis de inibição de crescimento celular.

Exemplo 32: Avaliação de conjugado de HSA ligante IGF-IR de armação de fibronectina

Proteínas de armação de fibronectina foram avaliadas com relação à inibição de proliferação mediada por soro usando a linhagem de célula de plasmacitoma humano NCI-H929. IGF-IR e proteínas de IGF-IR/HSA demonstraram graus comparáveis de inibição de crescimento celular (vide Figura 25).

Vários antagonistas de IGF-IR foram testados com relação à sua

atividade antitumor *in vivo* em xenoenxertos de sarcoma RH41 (vide Figuras 26 e 27). A Tabela II resume os resultados do estudo.

Tabela II. Atividade antitumor *in vivo* no estudo com sarcoma RH41

Composto	Esquema, via	Dose (mg/kg)	Alteração média de peso (g) ^c	LCK	TGI %*	p valor para TGI %*	Resultado através de LCK (TGI %)
Composto de IGF-IR	qdx21; 20 po ^a	50	-0,9	0,5	70	0,004	1(A)
385A08	2qdx20; 28 ip ^b	40	1,0	0,2	19	0,301	1(1)
385A08	2qdx20; 28 ip ^b	20	0,6	0,2	33	0,053	1(1)
385A08-PEG20-385A08	TIWx3; 20 ip ^b	40	0,1	0,6	66	0,001	1(A)
385A08-PEG40	TIWx3; 20 ip ^b	40	1,4	0,4	56	0,053	1(A)
385A08-HSA	TIWx3; 20 ip ^b	40	0,8	0,7	71	0,013	1(A)
Controle (não-tratado)	---	---	1,4	---	---	1,0	---

*Inibição de crescimento de tumor e valores de probabilidade calculados no dia 39.

^aVeículo foi PEG400 a 80%, 2H2O a 20%.

^bVeículo foi PBS.

^cAlteração média de peso para cada grupo é a diferença média entre o peso no início de tratamento (Dia 20) e após o final de tratamento (Dia 42). TVDT foi calculada para um também de 500 mg.

As abreviações usadas são como segue: po, via oral; ip, via in-

traperitoneal; LCK, morte celular log grosseira calculada como $LCK = T - C / (3,32 \times TVDT)$, onde T-C é a diferença no tempo, em dias, para que os tumores tratados (T) atinjam um tamanho predeterminado (tamanho alvo do tumor) com relação ao grupo tratado com veículo (C) dividido pelo tempo de duplicação de volume do tumor (TVDT), multiplicado por 3,31. TVDT era o tempo médio em dias para que tumores de controle atingissem o tamanho alvo - tempo médio em dias para que os tumores de controle atingissem metade do tamanho alvo; Resultados, um regime de tratamento era considerado ativo se ele produzia uma LCK estatisticamente significativa de $\geq 1,0$; TGI %, com relação à inibição % de crescimento de tumor, calculada como $TGI \% = [(C_t - T_t) / (C_t - C_0)] \times 100$, onde C_t = peso médio do tumor de camundongos de controle no tempo t, C_0 = peso médio do tumor de camundongos de controle no tempo 0. O valor de TGI % foi calculado em vários pontos de tempo, começando após uma duplicação de 1,5 vezes no tamanho do tumor e sustentada durante um período de tempo de duplicação de volume do tumor de 3 vezes, onde possível. Um valor de TGI % de $> 50\%$ era considerado ativo; composto a q2xd5 (como um exemplo de um esquema) foi administrado dia sim, dia não para cinco doses.

Proteínas de fusão de HSA-IGF-IR podem também ser geradas. O seguinte lista várias fusões de HSA N- e C-terminais ao clone 385A08 de IGF-IR. O líder de HSA e a sequência de pró-peptídeo são omitidos nos construtos C-terminais. O ligante Fn1 é derivado da sequência de aminoácido que liga os primeiro e segundo domínios de fibronectina do tipo III. O ligante Fn2 é derivado da sequência de aminoácido que liga os décimo e décimo primeiro domínios de fibronectina do tipo III (vide Figura 30).

Albumina de soro humano (não processada)-ligante Fn1-385A08; SEQ ID NO: 228

385A08-ligante Fn1-albumina de soro humano (não processada); SEQ ID NO: 229

albumina de soro humano (não processada)-ligante Fnr2-385A08; SEQ ID NO: 230

Albumina de soro humano (não processada)-ligante (GS)₅-

385A08; SEQ ID NO: 231

Albumina de soro humano (não processada)-ligante (GS)₁₀-

385A08; SEQ ID NO: 232

385A08-ligante Fn2-albumina de soro humano (processada);

5 SEQ ID NO: 233

385A08-ligante (GS)₅-albumina de soro humano (processada);

SEQ ID NO: 234

385A08-ligante (GS)₁₀-albumina de soro humano (processada);

SEQ ID NO: 235

10 **Exemplo 33: Avaliação de ligante de IGF-IR de armação de fibronectina ligado à transferrina**

Proteínas de armação de fibronectina fundidas à transferrina foram avaliadas com relação à inibição de proliferação mediada por soro usando a linhagem de célula de plasmacitoma humano NCI-H929.

15 Proteínas de fusão de polipeptídeo de transferrina-IGF-IR podem ser geradas. O seguinte lista várias fusões de transferrina N- e C-terminais ao clone 385A08 de IGF-IR. A sequência líder de transferrina é omitida nos construtos C-terminais (vide Figura 30).

Transferrina humana (não processada)-ligante Fn1-385A08;

20 SEQ ID NO: 236

385A08-ligante Fn1-Transferrina humana (processada); SEQ ID NO: 237

Transferrina humana (não processada)-ligante Fn2-385A08;

SEQ ID NO: 238

25 Transferrina humana (não processada)-ligante (GS)₅-385A08;

SEQ ID NO: 239

Transferrina humana (não processada)-ligante (GS)₁₀-385A08;

SEQ ID NO: 240

385A08-ligante Fn2-Transferrina humana (processada); SEQ ID

30 NO: 241

385A08-ligante (GS)₅-Transferrina humana (processada); SEQ

ID NO: 242

385A08-ligante (GS)₁₀-Transferrina humana (processada); SEQ
ID NO: 243

Exemplo 34: Proteínas de fusão de IGF-IR-Fc

Proteínas de armação baseada em fibronectina fundidas ao Fc
5 foram avaliadas com relação à sua capacidade de inibir várias linhagens de
célula. Os valores de IC₅₀ foram determinados para 385A08-Fc (aminoáci-
dos 90-423 de SEQ ID NO: 247) em células Rh41 (4,5 nM), células DU4475
(>50 nM), células H929 (0,15 nM), BXPC-3 (>500 nM) e células HT-29
(>1000 nM). A fusão IGF-IR-Fc demonstrou uma inibição máxima de 25 a
10 91% na linhagem de célula Rh41.

Proteínas de armação baseada em fibronectina fundidas ao Fc
foram avaliadas com relação à sua capacidade de inibir IGF-IR, fosforilação
de AKT e MAPK em células de rabdomiosarcoma humano (vide Figura 29).

Proteínas de armação baseada em fibronectina fundidas ao Fc
15 foram avaliadas com relação à sua capacidade de inibir a proliferação nas
linhagens de célula Rh41 e H929 (Tabela 12). As células foram tratadas com
concentrações em nM de 385A08-Fc, conforme notado. Os valores de IC₅₀
são como segue: Rh41 Experimento 1 (48,65 nM), Rh41 Experimento 2
(39,43 nM), média dos experimentos com Rh41 (44 nM) e experimento com
20 H929 (0,15 nM).

**Tabela 12. Efeito de 385A08-Fc sobre a proliferação celular nas linha-
gens de célula Rh41 e H929**

	Rh41 Experimento 1		Rh41 Experimento 2		Ensaio com H929	
nM	Incorpora- ção de [³ H]	Desvio padrão	Incorpora- ção de [³ H]	Desvio padrão	Incorpora- ção de [³ H]	Desvio padrão
50	54,9	2,67	52,1	3,27	20,2	1,52
10,0	61,9	1,56	59,3	1,14	18,4	0,89
2,0	77,9	2,86	78,6	1,9	20,6	0,62
0,4	97,1	2,26	94,6	1,08	32,0	1,97
0,08	102,9	1,14	98,4	0,52	57,1	3,87
0,016	101,2	1,26	102,5	0,95	80,1	3,09

Exemplo 35: Exemplos de métodos usados aqui

Os materiais e métodos a seguir foram usados para os experimentos descritos nos exemplos anteriores.

Proteínas recombinantes:

- IGF-I recombinante humano, IGF-IR, receptor de insulina (IR), MAB391 anti-IGF-IR e VEGF-R2-Fc humano recombinante foram obtidos da &D Systems (Minneapolis, MN). Biotinilação de IGF-IR foi realizada em 1 x PBS a 4 °C durante 2 horas na presença de EZ-10 Link™ Sulfo-NHS-LC-LC-Biotina (Pierce, IL). Excesso de EZ-10 Link™ Sulfo-NHS-LC-LC-Biotina foi removido através de diálise contra 1 x PBS. O nível de biotinilação foi determinado através de espectrometria de massa e as concentrações de proteína foram determinadas usando Coomassie Protein Plus Assay (Pierce, IL).

Iniciadores:

- Os seguintes oligonucleotídeos foram preparados através de síntese química para eventual uso em construção de biblioteca e mutagenese de clones selecionados:

T7TMV: 5'-TAA TAC GAC TCA CTA TAG GGA CAA TTA CTA TTT ACA ATT ACA ATG-3' (SEQ ID NO: 204)

FnAB: 5'-GGG ACA ATT ACT ATT TAC AAT TAC AAT GGT TTC TGA TGT GCC GCG CGA CCT GGA AGT GGT TGC TGC CAC CCC CAC CAG CCT GCT GAT CAG CTG G-3' (SEQ ID NO: 205)

FnBC: 5'-AGC CTG CTG ATC AGC TGG NNS NNS NNS NNS NNS NNS NNS CGA TAT TAC CGC ATC ACT-3' (SEQ ID NO: 206)

FnCD: 5'-AGG CAC AGT GAA CTC CTG GAC AGG GCT ATT GCC TCC TGT TTC GCC GTA AGT GAT GCG GTA ATA TCG-3' (SEQ ID NO: 207)

FnDE: 5'-CAG GAG TTC ACT GTG CCT NNS NNS NNS NNS ACA GCT ACC ATC AGC GGC-3' (SEQ ID NO: 208)

FnEF: 5'-AGT GAC AGC ATA CAC AGT GAT GGT ATA ATC AAC GCC AGG TTT AAG GCC GCT GAT GGT AGC TGT-3' (SEQ ID NO: 209)

FnFG6: 5'-ACT GTG TAT GCT GTC ACT NNS NNS NNS NNS NNS NNS CCA ATT TCC ATT AAT TAC-3' (SEQ ID NO: 210) para proporcionar uma alça FG com 6 aminoácidos aleatórios.

FnFG8: 5'-ACT GTG TAT GCT GTC ACT NNS NNS NNS NNS NNS NNS

NNS NNS CCA ATT TCC ATT AAT TAC-3' (SEQ ID NO: 211) para proporcionar uma alça FG com 8 aminoácidos aleatórios.

FnFG10: 5'-ACT GTG TAT GCT GTC ACT NNS NNS NNS NNS NNS NNS NNS NNS NNS CCA ATT TCC ATT AAT TAC-3' (SEQ ID NO: 212)

5 para proporcionar uma alça FG com 10 aminoácidos aleatórios.

FnFG12: 5'-ACT GTG TAT GCT GTC ACT NNS NNS NNS NNS NNS NNS NNS NNS NNS CCA ATT TCC ATT AAT TAC-3' (SEQ ID NO: 213) Para proporcionar uma alça FG com 12 aminoácidos aleatórios.

10 FnFG14: 5'-ACT GTG TAT GCT GTC ACT NNS NNS NNS NNS NNS NNS NNS NNS NNS NNS NNS NNS CCA ATT TCC ATT AAT TAC-3' (SEQ ID NO: 214) para proporciona uma alça FG com 14 aminoácidos aleatórios.

FnG: 5'-TTA AAT AGC GGA TGC CTT GTC GTC GTC GTC CTT GTA GTC TGT GCG GTA ATT AAT GGA AAT TGG-3' (SEQ ID NO: 215)

15 FLAG: 5'- TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTA AAT AGC GGA TGC CTT GTC GTC GTC GTC CTT GTA-3' (SEQ ID NO: 216)

218C04BC: 5'- AGC CTG CTG ATC AGC TGG TCC CCG TAC CTG CGC GTC GCC CGA TAT TAC CGC ATC ACT -3' (SEQ ID NO: 217)

20 218C04DE: 5'- CAG GAG TTC ACT GTG CCT TCC TCC GCC CGC ACA GCT ACC ATC AGC GGC-3' (SEQ ID NO: 218)

218C04FG: 5'- ACT GTG TAT GCT GTC ACT CCG TCC AAC ATC ATC GGC CGT CAC TAT GGC CCA ATT TCC ATT AAT TAC -3' (SEQ ID NO: 219)

FnB: 5'-AGC CTG CTG ATC AGC TGG -3' (SEQ ID NO: 220)

25 FnD: 5'-CAG GAG TTC ACT GTG CCT -3' (SEQ ID NO: 221)

FnF: 5'-ACT GTG TAT GCT GTC ACT -3' (SEQ ID NO: 222)

338A06BC: AGC CTG CTG ATC AGC TGG TCT GCG CGT CTG AAA GTT GCG CGA TAT TAC CGC ATC ACT (SEQ ID NO: 223)

30 338A06DE: CAG GAG TTC ACT GTG CCT AAA AAC GTT TAC ACA GCT ACC ATC AGC GGC (SEQ ID NO: 224).

Construção de biblioteca primária:

Uma biblioteca diversa foi construída através de extensão dos

oligonucleotídeos sintéticos de sobreposição listados acima usando KOD polimerase (EMD Biosciences, San Diego, CA). Nessas designações de oligonucleotídeo, "N" indica uma mistura de A, C, G e T; e "S" indica uma mistura de C e G. As definições de alça são idênticas àquelas descritas previamente (Xu e outros, 2002). A alça BC foi construído através de extensão de FnBC a 50 pmols com FnCD a 100 pmols em uma reação de KOD a 100 μ l que foi suplementada com Betaína a 1M e DMSO a 3%. A reação foi levada através de 10 ciclos de temperatura de 30s a 94 °C, 30s a 52 °C e 1 min.. a 68 °C para assegurar extensão completa dos fragmentos. As alças DE e FG foram construídas de uma maneira similar, usando FnDE a 200 pmols com FnEF a 100 pmols para a alça DE e FnFG10 a 100 pmols com FnG a 200 pmols para a alça FG. Após extensão dos 3 alças individuais, as alças DE e FG foram combinados e estendidos juntos durante mais 10 ciclos de temperatura de 30s a 94 °C, 30s a 52 °C e 1 min. a 68 °C. A alça BC foi estendido com FnAB a 100 pmols da mesma maneira. A mistura de DE/FG e a alça BC foram, cada um, diluídos 10 vezes com reagentes KOD frescos e estendidos com FLAG e T7TMV, respectivamente, durante 10 ciclos de temperatura de 30s a 94 °C, 30s a 52 °C e 1 min. a 68 °C. Finalmente, os fragmentos foram combinados e estendidos juntos durante 10 ciclos de temperatura de 30s a 94 °C, 30s a 52 °C e 1 min. a 68 °C. Isso produziu uma biblioteca com 7 aminoácidos aleatórios na alça BC, 4 aminoácidos aleatórios na alça DE e 10 aminoácidos aleatórios na alça FG. Bibliotecas adicionais foram construídas com diferentes comprimentos de alça FG usando os oligonucleotídeos FnFG6, FnFG8, FnFG12 ou FnFG14 ao invés de FnFG10. As bibliotecas contendo comprimentos de alça FG entre 6 e 14 aminoácidos foram combinadas para proporcionar uma biblioteca FG de comprimento variável.

Construção de bibliotecas aleatórias com única alça a partir do clone 218C04:

Três bibliotecas foram construídas nas quais alças únicas foram substituídas por uma sequência aleatória. As bibliotecas foram construídas a nível de DNA através de extensão por sobreposição com KOD polimerase

conforme descrito acima, exceto que sequências aleatórias em duas de três alças foram substituídas pela sequência fixa correspondendo ao clone 218C04. As sequências fixas foram fornecidas na alça BC através do oligonucleotídeo 218C04BC e na alça DE através do oligonucleotídeo 218C04DE e na alça FG através do oligonucleotídeo 218C04FG. Esses foram substituídos nos oligonucleotídeos aleatórios correspondentes FnBC, FnDE ou FnFG10 durante construção da biblioteca.

A biblioteca na qual a alça BC do clone 218C04 foi substituído por aminoácidos aleatórios foi feita montando os oligonucleotídeos: T7TMV + FnAB + FnBC + FnCD + 218C04DE + FnEF + 218C04FG + FnG + FLAG conforme descrito acima. A biblioteca na qual a alça DE do clone 218C04 foi substituído por aminoácidos aleatórios foi feita montando os oligonucleotídeos: T7TMV + FnAB + 218C04BC + FnCD + FnDE + FnEF + 10 218C04FG + FnG + FLAG. A biblioteca na qual a alça FG do clone 218C04 foi substituído pelos aminoácidos aleatórios foi montada a partir dos oligonucleotídeos: T7TMV + FnAB + 218C04BC + FnCD + 218C04DE + FnEF + FnFG10 + FnG + FLAG.

Construção de bibliotecas aleatórias com 3 alças a partir do clone 218C04:

As três bibliotecas com um única alça derivadas do clone 218C04 foram submetidas à seleção por PROfusion™, conforme descrito acima. Os clones que sobreviveram em cada biblioteca continham 2 alças do clone precursor e 1 alça da sequência aleatória que eram compatíveis com a ligação de cada proteína de armação baseada em fibronectina. As três alças aleatórias, um de cada biblioteca, foram amplificados usando primers de oligonucleotídeo que se ligam às regiões de armação circundantes. A alça BC foi amplificado a partir da biblioteca contendo a alça BC variável usando os primers de oligonucleotídeo FnB e FnCD. A alça DE foi amplificado a partir da biblioteca contendo a alça DE variável usando os primers de oligonucleotídeo FnD e FnEF. A alça FG foi amplificado a partir da biblioteca contendo a alça FG variável usando os primers de oligonucleotídeo FnF e FnG. Os três alças excisados foram purificados através de eletroforese em gel de agarose.

se, misturados em proporções iguais e amplificados através de KOD polimerase com os primers FnAB e FnG, seguido por T7TMV e FLAG.

Construção de uma biblioteca FG aleatória com única alça a partir do clone 338A06:

5 Uma biblioteca foi construída na qual a alça FG do clone 338A06 foi substituída por 6 aminoácidos aleatórios. KOD polimerase foi usada para extensão por sobreposição dos oligonucleotídeos T7TMV + FnAB + 338A06BC + FnCD + 338A06DE + FnEF + FnFG6 + FnG + FLAG, conforme descrito acima. As sequências de alça correspondendo ao clone 338A06
10 foram introduzidas através dos oligonucleotídeos 338A06BC e 338A06DE e a alça FG de 6 aminoácidos aleatório foi introduzido através do oligonucleotídeo FnFG6.

Produção de fusão de RNA-proteína:

Bibliotecas de DNA fita dupla foram convertidas em fusões de
15 RNA-proteína (PROfusion™) essencialmente conforme descrito (Xu e outros, 2002, Kurz e outros, *Nuc. Acid Res.* 28: 83, 2000). Resumidamente, a biblioteca de DNA foi transcrita usando um kit de transcrição *in vitro* (MEGAscript™, Ambion, Austin, Tex) e o RNA resultante foi dessalinizado através de cromatografia por exclusão de tamanho sobre uma coluna NAP-5
20 (GE Healthcare). 2 nmoles de RNA foram ligados cruzadamente através de irradiação a 314 nM durante 20 min. em 200 µl de uma solução contendo NaCl a 15- mM, Tris-HCl a 10 mM (pH de 8) e um excesso de 1,5 vezes de ligante contendo puromicina (5'-Pso u agc gga ugc XXX XXX CC Pu-3' (Pu = puromicina, Pso = C6-psoraleno, u, a, g, c = 2'-OMe-RNA, X = espaçador de
25 PEG com 9 átomos)).

As moléculas de mRNA-puromicina foram, então, traduzidas em 3 ml de lisato de reticulócito de coelho (Ambion, Austin, Tex) na presença de metionina ³⁵S-rotulada. As fusões de mRNA-proteína resultantes foram purificadas usando oligo dT celulose (GE Healthcare) e inversamente transcritas
30 usando transcriptase reversa Superscript II (Invitrogen) e 2 nmoles do primer FLAG de acordo com as instruções do fabricante.

As fusões de cDNA/mRNA-proteína foram purificadas através de

M2 Flag agarose (Sigma, St Louis, MO) e quantificadas através de medição da ^{35}S -metionina incorporada. Isso proporcionou uma biblioteca purificada de aproximadamente 1012 proteínas de armação baseada em fibronectina de comprimento total que foram amplificadas através de PCR usando os primers T7TMV e FLAG para uso em subsequentes experimentos de PROfusionTM.

Seleção por afinidade com relação à ligação ao IGF-IR:

Bibliotecas de fusões de mRNA-proteína, preparadas conforme descrito acima, foram incubadas com glóbulos magnéticos revestidos de estreptavidina (M280 Streptavidin, Invitrogen) para remover proteínas de armação baseada em fibronectina que se ligam à estreptavidina. Os glóbulos foram separados sobre um ímã e a fração não-ligada foi coletada e adicionada a IGF-IR biotinilado a 100 nM em PBS com Tween 20 a 0,05% e 1 mg/ml de BSA (Ambion). Após 30 min., as proteínas de armação baseada em fibronectina ligadas foram capturadas sobre glóbulos magnéticos revestidos com estreptavidina e lavadas 6 vezes usando um processador de partícula magnético Kingfisher (Thermo Electron, Waltham, MA). O cDNA foi eluído em KOH a 100 mM, neutralizado com Tris-HCl a 100 mM e amplificado através de PCR para gerar uma biblioteca de segunda geração enriquecida em moléculas que se ligam ao IGF-IR. Os processos consecutivos de amplificação, síntese de fusões de mRNA-proteína e seleção por afinidade foram realizados um total de 5 vezes e o número de moléculas ligadas foi monitorado através de PCR quantitativa. As populações de proteína de armação baseada em fibronectina obtidas após os ciclos 4 e 5 foram amplificadas e ligadas através de recombinação (InFusionTM, Clontech, Mountain View, CA) em um vetor de expressão de *E. coli* contendo um promotor para RNA polimerase T7 e uma tag His6 em-rede. A mistura ligada foi transformada na cepa BL21 de *E. coli* (DE3) pLysS (Invitrogen) que expressa RNA polimerase T7 quando de indução com IPTG, desse modo, proporcionando expressão de proteína induzível.

Otimização do clone 218C04 contendo 3 alças aleatórias:

A biblioteca de 218C04 aleatória com 3 alças foi submetida a

ciclos de amplificação, síntese de fusões de mRNA-proteína e seleções por afinidade conforme descrito acima. Para o primeiro ciclo, IGF-IR foi imobilizado sobre glóbulos ativados com epóxi para evitar seleção de peptídeos de ligação à estreptavidina. Após o que, IGF-IR biotinilado foi usado em concentrações diminuídas para selecionar os ligantes de maior afinidade. Do ciclo 2 em diante, receptor de insulina não-biotinilado (IR) também foi incluído em uma concentração de 1 μ M para atuar como uma seleção negativa pela ligação ao IR. Após 4 ciclos, as populações de proteína de armação baseada em fibronectina resultante foram clonadas em *E. coli* para análise, conforme descrito acima.

Otimização do clone 338A06 contendo uma alça FG aleatório de 6 aminoácidos:

A biblioteca de DNA foi convertida em fusões de mRNA-proteína conforme descrito acima para proporcionar cerca de 1000 cópias de cada sequência de alça FG. Ciclos de amplificação por PROfusion™, formação de fusão de mRNA-proteína e seleção por afinidade foram realizados conforme descrito acima. No primeiro ciclo, a concentração de IGF-IR biotinilado foi de 100 nM, mas essa caiu pra 0,8 nM no ciclo 2 e 0,4 nM no ciclo 3. A concentração alvo foi escolhida de modo que o percentual de fusões de mRNA-proteína ligadas ao IGF-IR fosse de menos de 0,1% em cada caso, conforme medido através de PCR quantitativa. Através desse método, proteínas de armação baseada em fibronectina com afinidade aperfeiçoada teriam uma vantagem comparado com a população como um todo.

ELISA competitivo para IGF-IR:

Lâminas MaxiSorp™ (Nunc International, Rochester, NY) foram revestidas com IGF-IR a 30 nM em PBS a 4 °C durante a noite, seguido por bloqueio em tampão OptEIA (BD biosciences, San Diego, CA) durante 3 horas em temperatura ambiente. Proteínas de armação baseada em fibronectina purificadas em tampão OptEIA foram ligadas a cada cavidade durante 1 hora em temperatura ambiente em concentrações oscilando de 50 pM a 1 μ M. Após lavagem em PBST para remover as proteína de armação baseadas em fibronectina não-ligadas, IGF-I biotinilado a 10 nM (Upstate, Temecu-

la, CA) foi adicionado durante 1 hora em temperatura ambiente para ligar o IGF-IR desocupado. O ligante em excesso foi removido através de lavagem com PBST e o ligante ligado foi detectado com estreptavidina- HRP (Pierce, Rockford, IL) usando reagentes de detecção TMB (BD biosciences) de acordo com as instruções do fabricante.

ELISA de ligação direta para IGF-IR:

Lâminas MaxiSorp™ (Nunc International, Rochester, NY) foram revestidas com IGF-IR a 10 nM em PBS a 4 °C durante a noite, seguido por bloqueio em tampão de PBS-caseína (Pierce) durante 3 horas em temperatura ambiente. Proteínas de armação baseada em fibronectina purificadas em tampão de caseína foram ligadas a cada cavidade durante 1 hora em temperatura ambiente em uma concentração de 5 nM. A lâmina foi lavada com PBST e 100 µl de uma diluição a 1:4000 de sonda His-HRP (Pierce) foram adicionados a cada cavidade, com incubação durante 15 min. em temperatura ambiente. As cavidades foram lavadas 5 vezes com PBST e a HRP ligada foi detectada com reagentes de detecção TMB (BS Biosciences) de acordo com as instruções do fabricante. Clones que mostraram ligação nesse ensaio de um único ponto foram analisados usando um gradiente de concentrações de proteína de armação baseada em fibronectina oscilando de 30 pmols a 330 nM.

Produção de proteína em alto rendimento (HTPP):

Ligantes selecionados clonados no vetor pDEST-14 e transformados em células pLysS de *E. coli* BL21 (DE3) foram inoculados em 5 ml de meio LB contendo 50 µg/mL de carbenicilina e 34 µg/mL de cloranfenicol em um formato de 24 cavidades e crescidas a 37 °C durante a noite. Culturas de 5 ml de meio LB fresco (50 µg/mL de carbenicilina e 34 µg/mL de cloranfenicol) foram preparadas para expressão induzível através de aspiração de 200 µl da cultura durante a noite e distribuição da mesma na cavidade apropriada. As culturas foram crescidas a 37 °C até uma A₆₀₀ de 0,6-1,0. Após indução com isopropil-P-tiogalactosídeo (IPTG) a 1 mM, a cultura foi crescidas durante mais 4 horas a 30 °C e coletada através de centrifugação durante 30 minutos a 3220 g a 4 °C. Os péletes de célula foram congeladas a -80 °C.

Os péletes de célula (no formato de 24 cavidades) foram submetidos à lise através de ressuspensão em 450 µl de tampão de lise (NaH_2PO_4 a 50 mM, NaCl a 0,5 M, 1x Complete™ Protease Inhibitor Cocktail isento de EDTA (Roche), PMSF a 1 mM, CHAPS a 10 mM, imidazola a 40 mM, 1 mg/ml de lisozima, 30 µg/ml de DNase, 2 µg/ml de aprotinina, pH de 8,0) e agitadas em temperatura ambiente durante 1 hora. Os lisatos foram clarificados e re-colocados em uma formato de 96 cavidades através de transferência para um Whatman GF/D Unifilter para 96 cavidades adaptado com uma lâmina de captura de 650 µl com 96 cavidades e centrifugadas durante 5 min. a 200 g. Os lisatos clarificados foram transferidos para uma Ni-Chelating Plate com 96 cavidades que tinha sido equilibrada com tampão de equilíbrio (NaH_2PO_4 a 50 mM, NaCl a 0,5 M, CHAPS a 10 mM, imidazola a 40 mM, pH de 8,0) e incubada durante 5 min.. O material não-ligado foi removido através de vácuo. A resina foi lavada 2 x 0,3 ml/cavidade com Tampão de Lavagem #1 (NaH_2PO_4 a 50 mM, NaCl a 0,5 M, CHAPS a 5 mM, imidazola a 40 mM, pH de 8,0) com cada lavagem removida através de vácuo. Em seguida, a resina foi lavada com 3 x 0,3 ml/cavidade com PBS com cada etapa de lavagem removida através de vácuo. Antes de eluição, cada cavidade foi lavada com 50 µl de Tampão de Eluição (PBS + EDTA a 20 mM), incubada durante 5 min. e essa lavagem descartada através de vácuo. A proteína foi eluída aplicando mais 1000 µl de tampão de eluição a cada cavidade. Após uma incubação de 30 minutos em temperatura ambiente, a(s) lâmina(s) foi(ram) centrifugada(s) durante 5 minutos a 200 g e a proteína eluída coletada em lâminas de captura com 96 cavidades contendo 5 µl de MgCl_2 a 0,5 M afixada ao fundo das placas de Ni. A proteína eluída foi quantificada usando um ensaio de Bradford com BSA como o padrão de proteína.

Expressão em escala mediana e purificação de ligantes de proteína de armação baseada em fibronectina solúveis:

Para expressão, clone(s) selecionado(s), seguido pela tag His6, foram clonados em um vetor pDEST-14 e expressos em células pLysS de *E. coli* BL21 (DE3). 20 ml de uma cultura de inóculo (gerada a partir de uma única colônia em lâmina) foram usados para inocular 1 litro de meio LB con-

tendo 50 µg/mL de carbenicilina e 34 (g/mL de cloranfenicol. A cultura foi crescida a 37 °C, até uma A600 de 0,6-1,0. Após indução com isopropil-p-tiogalactosídeo (IPTG) a 1 mM, a cultura foi crescida durante mais 4 horas a 30 °C e coletada através de centrifugação durante 30 minutos a (10.000 g a 4 °C. Os péletes de célula foram congeladas a -80 °C. O pélete de célula foi ressuspenso em 25 mL de tampão de lise (NaH₂PO₄ a 50 mM, NaCl a 0,5 M, 1 x Complete™ Protease Inhibitor Cocktail-isento de EDTA (Roche), PMSF a 1 mM, pH de 7,4) usando um homogeneizador Ultra-turrax (IKA Works) sobre gelo. A lise de célula foi obtida através de homogeneização em alta pressão ((18.000 psi) usando um Microfluidificador Modelo M-110S (Microfluidics). A fração solúvel foi separada através de centrifugação durante 30 minutos a 23.300 g a 4 °C. O sobrenadante foi clarificado via um filtro de 0,45 µm. O lisato clarificado foi carregado sobre uma coluna HisTrap (GE) pré-equilibrada com NaH₂PO₄ a 20 mM, NaCl a 0,5 M, pH de 7,4. A coluna foi, então, lavada com 25 volumes de coluna de NaH₂PO₄ a 20 mM, NaCl a 0,5 M, pH de 7,4, seguido por 20 volumes de coluna de NaH₂PO₄ a 20 mM, NaCl a 0,5 M, imidazola a 25 mM, pH de 7,4 e, então, 35 volumes de coluna de NaH₂PO₄ a 20 mM, NaCl a 0,5 M, imidazola a 40 mM, pH de 7,4. A proteína foi eluída com 15 volumes de coluna de NaH₂PO₄ a 20 mM, NaCl a 0,5 M, imidazola a 500 mM, pH de 7,4, as frações empoçadas baseado na absorbância a A₂₈₀ e submetidas à diálise contra 1 x PBS ou NaOAc a 50 mM; NaCl a 150 mM; pH de 4,5. Qualquer precipitado foi removido através de filtração a 0,22 µm.

PEGuilação da armação de fibronectina anti-IGF-IR

A molécula armação de fibronectina-PEG40 foi preparada usando um excesso de 2 vezes de PEG-40-kDa (NOF Corporation) ao C-término da armação de fibronectina via química de maleimida. A reação foi deixada processar em temperatura ambiente durante 2,5 horas. PEG-40 livre foi separado da armação de fibronectina-PEG-40 através de cromatografia de troca de cátions (SP-HiTrap; GE). A mistura de reação foi diluída a 1:10 com NaH₂PO₄ a 20 mM, pH de 6,7 e aplicada a uma coluna SP-HiTrap pré-equilibrada com tampão de Equilíbrio (NaH₂PO₄ a 20 mM, NaCl a 10 mM, pH

de 6,7), lavada com tampão de Equilíbrio e eluída usando NaH_2PO_4 a 20 mM, NaCl a 0,5 M, pH de 6,7. As frações eluídas foram empocadas baseado em análise de SDS-PAGE. O tampão do eluato SP-empocado foi trocado via G25 Chromatografia (GE) em PBS.

5 A PEG20-armação de fibronectina-PEG20 foi preparada usando um excesso de 2x da armação de fibronectina purificada-C a PEG-20-kDa (NOF Corporation) via química de maleimida. A reação foi realizada em temperatura ambiente durante 1 hora. A armação de fibronectina não-peguilada foi separada da PEG20-armação de fibronectina-PEG 20 através de SEC
10 Chromatography (Superose 6; GE) em tampão de NaH_2PO_4 a 20 mM, NaCl a 1,0 M, pH de 6,7. As frações contendo a PEG20-armação de fibronectina-PEG20 foram empocadas e ainda purificadas para remover a armação de fibronectina mono-peguilada. Isso foi obtido através de cromatografia de troca de cátions (SP; GE). Uma coluna SP-HiTrap foi pré-equilibrada com
15 Tampão A (NaH_2PO_4 a 20 mM, NaCl a 10 mM, pH de 6,7), o eluato de SEC foi aplicado, a coluna foi, então, lavada com Tampão A e, então, um gradiente de tampão B de 0-10% (NaH_2PO_4 a 20 mM, NaCl a 1,0 M, pH de 6,7) sobre 5 volumes de coluna e mantido até mais 5 volumes de coluna serem passados. PEG20-armação de fibronectina-PEG20 foi eluída da coluna SP
20 através de eluição com Tampão B a 50%. As frações foram empocadas através da A_{280} e o tampão trocado para PBS através de G25 Chromatografia (GE).

Produção de ligantes de IGF-IR-PEG-VEGFR2

PEG20 foi pesada em uma microbalança e dissolvida para 100
25 mg/ml (5 mM) em fosfato de sódio a 20 mM/NaCl a 10 mM, pH de 6,7. Solução de PEG foi adicionada à solução de clone 385A08 (SEQ ID NO: 203) em uma proporção molar de 5:1 (PEG:proteína). A reação foi incubada em temperatura ambiente durante pelo menos uma hora com mistura.

Para separar 385A08-PEG20 do PEG não-acoplado, Bis-
30 385A08, monômero de 385A08 não-peguilado e dímero dissulfeto-ligado de 385A08, a reação de PEG-proteína foi carregada sobre uma coluna de troca de cátions HiTrap SP equilibrada com fosfato de sódio a 20 mM/NaCl a 10

mM, pH de 6,7 (Tampão A). Tampão de eluição (Tampão B) é fosfato de sódio a 20 mM/NaCl a 1,0 M, pH de 6,7. Eluição isocrática com B a 10% (NaCl a 100 mM) isola espécies 385A08-PEG20, a qual é usada para reagir com o ligante específico de VEGFR2 (SEQ ID NO: 128). A adição do ligante específico de VEGFR2 a 385A08-PEG20 forma o heterodímero de ligante específico 385A08-PEG20-VEGFR2.

Cromatografia por exclusão de tamanho foi realizada para separar o ligante específico de VEGFR2 monomérico e dimérico não-acoplado do heterodímero de ligante específico 385A08-PEG20-VEGFR2. Uma coluna Superdex 200 foi equilibrada com fosfato de sódio a 20 mM/NaCl a 10 mM, pH de 6,7. A 385A08-PEG20 mais a mistura de reação de ligante específico de VEGFR2 foi aplicada em uma taxa de fluxo de 1,0 ml/min.. Frações correspondendo ao ligante específico 385A08-PEG20-VEGFR2 foram empoadas como um produto final.

15 **Análise BIAcore das proteínas de armação baseada em fibronectina solúveis:**

A cinética de ligação de proteínas de armação baseada em fibronectina às proteínas alvo foi medida usando biosensores BIAcore 2000 ou 3000 (Pharmacia Biosensor). Um ensaio de captura foi desenvolvido utilizando uma fusão de IGF-IR-Fc. Um reagente similar tinha sido descrito por Forbes e outros (Forbes e outros 2002, European J. Biochemistry, 269, 961-968). O domínio extracelular de IGF-IR humano (aa 1-932) foi clonado em um vetor de expressão de mamífero contendo as regiões de dobradiça e constante de IgG1 humana. Transfecção transitória do plasmídeo produziu uma proteína de fusão, IGF-IR-Fc, a qual foi subsequentemente purificada através de cromatografia em Proteína A e capturada sobre Proteína A imobilizada sobre chips Biasensor CM5 através de acoplamento de amina. A análise de cinética envolveu a captura de IGF-IR-Fc sobre Proteína A, seguido por injeção de proteína de armação de fibronectina em solução e regeneração da superfície de Proteína A através de glicina, pH de 2,0. Sensogramas foram obtidos em cada concentração e foram avaliados usando um programa de Bioavaliação, BIA Evaluation 2.0 (BIAcore), para determinar as cons-

4. tantes de taxa k_a (k_{on}) e k_d (k_{off}). A constante de dissociação, K_D , foi calculada a partir da proporção de constantes de taxa k_{off}/k_{on} . Tipicamente, uma série de concentrações (2 μ M a 0 μ M) de proteína de armação baseada em fibronectina foram avaliadas com relação à ligação à proteína de fusão IGF-
5 IR-Fc humana capturada em proteína A.

Para experimentos de determinação da ligação ao receptor de insulina humano, receptor de insulina humano recombinante (IR) e VEGF-R2-Fc recombinante humano foram diretamente acoplados a um chip CM5 5 Biasensor através de ligação do grupo amina, seguido por procedimentos
10 padrões recomendados pela Biacore (Uppsala, Suécia). Em resumo, 60 μ g/mL de IR diluído em acetato 4.5 foram acoplados/imobilizados a um nível de 8300 RU e 11,9 μ g/mL de VEGF-R2-Fc diluído em acetato 5.0 foram imobilizados a um nível de 9700 RU sobre células de fluxo 2 e 3. Uma superfície de referência com placebo foi preparada sobre FC1. A ligação específica
15 ca ao IR ou VEGF-R2-Fc foi calculada subtraindo a ligação observada à célula de fluxo 1 de referência com placebo. Proteínas de armação baseada em fibronectina foram diluídas para 10 μ M em HBS-EP (Hepes a 10 mM, NaCl a 150 mM, EDTA a 3 mM, Surfactant P20 a 0,05%) e injetadas a 20 μ L/min. durante 3 minutos sobre as células de fluxo a 25 °C e a dissociação
20 foi observada durante 10 min..

Calorimetria de exploração diferencial:

Análise por calorimetria de exploração diferencial (DSC) de clones em escala mediana foi realizada para determinar a estabilidade térmica. Uma solução a 1 mg/ml de um clone apropriado foi explorada em um calorímetro N-DSC II (Calorimetry Sciences Corp) elevando a temperatura de 5 °C
25 para 95 °C em uma taxa de 1 grau por minuto sob pressão de 3 atm. Os dados foram analisados vs. uma operação de controle do tampão apropriado usando a melhor adaptação usando o Software Origin (OriginLab Corp).

Cromatografia por exclusão de tamanho:

30 Cromatografia por exclusão de tamanho (SEC) foi realizada usando uma coluna TSKgel Super SW2000 (TOSOH Biosciences, LLC), 4,6 mm x 30 cm, sobre um sistema de HPLC Agilent 1100 com detecção por UV

a A214 nm e A280 nm e com detecção por fluorescência (excitação = 280 nm, emissão = 350 nm). Um tampão de sulfato de sódio a 100 mM, fosfato de sódio a 100 mM, cloreto de sódio a 150 mM, pH de 6,8 em uma taxa de fluxo de 100 μ L/min. foi empregado. Amostras (0,1 a 1 μ g cada) em uma
5 concentração de aproximadamente 100 μ g/mL foram injetadas separadamente. Padrões de filtração em gel (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA) foram usados para calibração de peso molecular.

Análise por SEC MALLS de clones de armação de fibronectina de IGF-IR:

10 Cromatografia por exclusão de tamanho (SEC) foi realizada sobre um sistema de HPLC Waters Breeze equipado com um detector de UV Water 2487 usando uma coluna Superdex 200 (GE Healthcare) com uma fase móvel de sulfato de sódio a 100 mM, fosfato de sódio a 100 mM, cloreto de sódio a 150 mM, pH de 6,8 aplicado em uma taxa de fluxo de 0,6 ml/min..
15 As amostras foram diluídas para aproximadamente 1,0 mg/ml com fase móvel e 50 μ l foram injetados. Análise por Dispersão de Luz a Laser em Multi-ângulo (MALLS) foi realizada usando um detector miniDAWN Light Scattering (Wyatt Technology Corporation) e um Refractômetro Diferencial Optilab DSP (Wyatt Technology Corporation) plugado em-linha após o detector de
20 UV. Análise dos dados de dispersão de luz foi realizada usando o software Astra V versão 5.1.9.1 (Wyatt Technologies Corporation). Para calcular a concentração da proteína de armação baseada em fibronectina através da absorvância a 280 nm, um coeficiente de extinção molar teórico baseado na sequência de aminoácido foi usado. Para determinação de concentração
25 pelo Índice Refrativo, um incremento de índice refrativo específico estimado (dn/dc) de 0,185 mL/g foi usado.

Cromatografia por RP-HPLC:

HPLC de fase reversa (RP-HPLC) foi realizada usando uma coluna C4 Polymer #259VHP5415 (Vydac), 4,6 mm x 15 cm, aquecida para 60
30 °C sobre um sistema de HPLC Agilent 1100 com detecção por UV a A214 nm e A280 nm e detecção por fluorescência (excitação = 280 nm, emissão = 350 nm). Solvente A consistia em água MilliQ contendo TFA a 0,01%, Sol-

1 vente B era acetonitrilo com grau para HPLC a 100% contendo TFA a
2 0,01%. Uma taxa de fluxo de 1 mL/min. foi empregada. O esquema de elui-
3 ção consistia em uma condição de equilíbrio de B a 10% durante 10 min.,
4 seguido por um gradiente linear de B a 50% durante o curso de 30 min.. Sob
5 essas condições, proteínas de armadilha baseada em fibronectina eluíram a
6 aproximadamente 25 a 30 minutos do tempo de operação total.

Espectrometria de massa MALDI TOF:

7 Proteínas de armadilha baseada em fibronectina foram analisa-
8 das através de um espectrômetro de massa Matrix Assisted Laser Desorpti-
9 on Ionization Time of Flight (MALDI-TOF) (figura 14) usando um espectrôme-
10 tro de massa Voyager DE PRO (Applied Biosystems). As amostras foram
11 diluídas para aproximadamente 1,0 mg/ml com TFA a 0,1%. Aproximada-
12 mente 12 µl de cada amostra foram carregados sobre uma C4 ZipTip (Milli-
13 pore Corporation) e lavadas com ácido trifluoroacético (TFA) a 0,1% para
14 remover os sais e contaminantes. A amostra foi diluída diretamente da Zip-
15 Tip sobre a lâmina alvo usando 2 µl de matriz de Ácido Sinapínico (10 mg/ml
16 em acetonitrilo a 70%, TFA a 0,1%). Padronização do instrumento foi reali-
17 zada usando duas proteínas de massa conhecida: Citocromo C (12361,96
18 Da) e Apomiglobina (16952,27 Da) preparadas em uma concentração final
19 de 5 µM em Ácido Sinapínico e colocadas sobre a lâmina. Os espectros fo-
20 ram adquiridos com os seguintes ajustes do instrumento: Tensão de Acele-
21 ração de 25000V, Tensão de Grade de 91%, Fio Guia de 0,1%, Tempo de
22 Retardo de Extração de 400 nseg, Intensidade do Laser de 3824. Os espec-
23 tros brutos foram processados no Data Explorer v. 4.5 (Applied Biosystems)
24 aplicando correção de linha de base e o algoritmo de Nivelamento Gaussia-
25 no com um valor de largura de filtro de 9.

Ensaio de mitogênese celular:

26 A linhagem de célula de adenocarcinoma pancreático humano
27 BxPC-3 (ATCC, Manassas, VA) foi colocada em lâminas com 96 cavidades
28 em uma concentração de 2500 células por cavidade em RPMI1640 (Invitro-
29 gen, Carlsbad, CA) contendo soro fetal bovino a 10% (Hyclone, Logan, UT).
30 No dia seguinte, as células foram lavadas em meio de privação consistindo

em RPMI 1640 contendo BSA a 0,1% (Sigma, St. Louis, MO). As células lavadas foram pré-incubadas durante quatro horas em meio de privação contendo várias concentrações de cada antagonista de IGF-IR. Após uma hora de pré-incubação, as células foram expostas ao IGF-I a 25 ng/mL e deixadas
5 incubar durante 24 horas a 37° C, 5% de CO₂. Durante as quatro horas finais de incubação, as células foram expostas a [³H]-Timidina (0,25 µCi/cavidade; Perkin Elmer, Wellesley, MA). Após o período de incubação, as células foram lavadas em PBS, submetidas à lise em 100 µL de tampão consistindo em SDS a 0,1% + NaOH a 0,5 N e contadas em um Contador de cintilação
10 TopCount NXT (Perkin Elmer, Wellesley, MA). Os dados foram analisados usando o SigmaPlot (Systat Software, Point Richmond, CA).

Ensaio de bloqueio de receptor baseado em célula:

A linhagem de adenocarcinoma de mama humano MCF-7 (ATCC, Manassas, VA) foi colocada em lâminas com 24 cavidades em uma
15 concentração de 50.000 células por cavidade em RPMI 1640 (Invitrogen, Carlsbad, CA) contendo soro bovino fetal a 10% (Hyclone, Logan, UT). No dia seguinte, as células foram lavadas em tampão de ligação consistindo em RPMI 1640 contendo BSA a 0,1% (Sigma, St. Louis, MO) e, então, pré-incubadas durante 30 minutos sobre gelo em 200 µL de tampão de ligação
20 contendo competidor de IGF-IR. Após o período de pré-incubação, [¹²⁵I]-IGF-I a 40 pM (Perkin Elmer, Wellesley, MA), equivalente a aproximadamente 60000 contagens por minuto, foi adicionado a cada cavidade e deixado incubar durante mais três horas sobre gelo com ligeira agitação. As cavidades foram, então, lavadas com PBS gelado contendo BSA a 0,1%. As células
25 foram submetidas à lise com 500 µL de tampão consistindo em SDS a 0,1% + NaOH a 0,5 N. A radioatividade dos lisatos foi medida usando um Contador Gama Wallac 1470 (Perkin Elmer, Wellesley, MA) e os dados foram analisados usando o SigmaPlot (Systat Software, Point Richmond, CA).

Ensaio de proliferação de célula NCI-H929:

30 A linhagem de célula de plasmacitoma humano NCI-H929 (ATCC, Manassas, VA) foi colocada em lâminas com 96 cavidades em uma concentração de 10000 ou 25000 células por cavidade em DMEM (Invitro-

gen, Carlsbad, CA) contendo soro bovino fetal a 10% (Hyclone, Logan, UT) contendo várias concentrações de antagonistas de IGF-IR. As células foram deixadas proliferar durante 72 horas a 37° C, 5% de CO₂. Após o período de proliferação, as células foram expostas a 20 µL de Cell Titer 96 Aqueous Proliferation Reagent (Promega, Madison, WI) e deixadas incubar durante mais quatro horas. A absorbância a 490 nm foi medida sobre um Spectramax Plus 384 (Molecular Devices, Sunnyvale, CA) e os dados resultantes foram analisados usando o SigmaPlot (Systat Software, Point Richmond, CA).

10 **Ensaio de proliferação de célula 32D:IGF-IR:**

Células (10^4) foram cultivadas em lâminas com 96 cavidades em RPMI (Invitrogen, Carlsbad, CA) contendo soro bovino fetal a 10% (Hyclone, Logan, UT) na presença de 100 ng/mL de IGF-I humano (R&D Systems, Minneapolis, MN) e antagonistas de IGF-IR. As células foram deixadas proliferar durante 72 horas a 37° C, 5% de CO₂. Após o período de proliferação, as células foram expostas ao Cell Titer 96 Aqueous Proliferation Reagent (Promega, Madison, WI) e deixadas incubar durante mais quatro horas. A absorbância a 490 nm foi medida sobre um Spectramax Plus 384 (Molecular Devices, Sunnyvale, CA) e os dados resultantes foram analisados usando o SigmaPlot (Systat Software, Point Richmond, CA).

20 **Ensaio de proliferação de célula Ba/F3:VEGFR2:**

Uma linhagem de célula pro-B IL-3-dependente de murino foi manipulada para superexpressar um VEGFR2 quimérico (domínio extracelular)/EpoR (domínio intracelular), desse modo, se tornando uma célula VEGF-dependente. Células BaF3:VEGFR2 ($2,5 \times 10^4$) foram cultivadas em lâminas com 96 cavidades em RPMI (Invitrogen, Carlsbad, CA) contendo soro fetal bovino a 10% (Hyclone, Logan, UT) na presença de antagonistas de VEGFR2. As células foram deixadas proliferar durante 72 horas a 37° C, 5% de CO₂. Após o período de proliferação, as células foram expostas ao Cell Titer 96 Aqueous Proliferation Reagent (Promega, Madison, WI) e deixadas incubar durante mais quatro horas. A absorbância a 490 nm foi medida sobre um Spectramax Plus 384 (Molecular Devices, Sunnyvale, CA) e os dados resul-

tantes foram analisados usando o SigmaPlot (Systat Software, Point 5 Richmond, CA).

Produção de conjugado de IGF-IR-HSA:

BM(PEO)₂ foi adicionado em excesso molar ao clone 385A08 (SEQ ID NO: 203). 385A08-BM(PEO)₂ foi isolado através de cromatografia de troca de cátions. Albumina de soro humano recombinante com grupo sulfidril livre foi adicionado a 385A08-BM(PEO)₂ para formar HSA-385A08. O conjugado foi ainda purificado através de cromatografia de troca de ânions e cátions.

Produção de fusão de IGF-IR-Fc:

O carboxi término de 385A08 (SEQ ID NO: 226) (sublinhado) foi unido à região amino-terminal de um fragmento Fc (dobradiça de Fc-CH₂-CH₃) (negrito). Um espaçador (em letra minúscula) foi colocado entre os dois de forma a minimizar o risco de impedimento estérico. O vetor de expressão foi criado para permitir que a molécula fosse expressa em células de pichia, o que é mais rápido do que a abordagem tradicional com células de mamífero. O vetor de expressão também inclui um peptídeo sinalizador de fator alfa (em *italico*) para permitir secreção durante expressão em células de pichia. Essa sequência sinalizadora é removida quando de secreção e não é parte da molécula final purificada de IGF-IR-Fc. A sequência do construto de expressão resultante é fornecida abaixo.

MRFPSIFTAVLFAASSALAAPVNTTTEDETAQIPAEAVIGYSDLEGDFDVAVL
PFSNSTNNGLLFINTTIIASIAAKEEGVSLEKREAEAGVSDVPRDLEVVAATPT
LLISWSARLKVARYYYRITYGETGGNSPVQEFTVPKNVYTATISGLKPGVDY
TITVYAVTRFRDYQPISINYRTEIDKPSQ*dpgs***EPKSCDKTHTCPPCPAPELL**
GGSSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVH
NAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKT
ISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNG
QPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHN
HYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 247)

O construto de expressão foi linearizado e transformado em células hospedeiras de Pichia, X-33, GS115 e KM17H. Transformantes foram

selecionados sobre lâminas com zeocina e selecionados com relação à expressão de IGF-IR-Fc em culturas de 2 ml. Os clones selecionados foram crescidos em frascos de agitação em pH variado e purificado através de resina de Proteína A. A expressão foi observada em um pH de 6,5 a 7,0. Todo o frasco de agitação de um dos clones foi usado para expressar IGF-IR-DPGG-Ig em um pH de 6,7 e purificar via exclusão de tamanho e proteína A;

A Figura 28 representa uma análise por SDS PAGE da proteína de fusão de IGF-IR-Ig purificada. Conforme pode ser visto, a massa observada é cerca de metade das amostras não-reduzidas, conforme é esperado para uma IGF-IR-Ig intacta dissulfeto-ligada.

Estudo de tumor *in vivo* de conjugados de IGF-IR-HSA

Tumores foram propagados em camundongos nus. As passagens de tumor ocorreram a cada quatro semanas para xenoenxertos de RH41 humano. Com relação à testagem de eficácia, os xenoenxertos de tumor foram implantados em camundongos nus. Todas as passagens de tumor foram subcutâneas (sc).

A atividade antitumor foi avaliada em termos de: (a) curas e, para os modelos de tumor de murino, aumentos na expectativa de vida refletidos pelo tempo médio de sobrevivência relativa (MST) de grupos tratados (T) versus o controle (C) (isto é, valores % de T/C); e (b) inibição de crescimento de tumor primário determinada calculando-se os tempos médios relativos para que camundongos T e C crescessem tumores de um tamanho "alvo" predeterminado (1 gm para todos os modelos de tumor sc descritos) e expressa como valores de T-C, em dias. A definição de um camundongo curado foi aquela onde o tumor era indetectável ou < 35 mg, quando avaliado mais de 10 vezes a duplicação de volume do tumor (TVDTs) pós-tratamento. O critério de avaliação para inibição/redução de tumor foi um retardo estatisticamente significativo no crescimento de tumor primário consistente com ≥ 1 morte de célula log grosseira (LCK). A seguinte fórmula foi empregada para calcular a LCK:

$$LCK = T-C/(3,32 \times TVDT)$$

onde TVDT = tempo médio (dias) para que tumores de controle atingissem o

tamanho alvo - tempo médio (dias) para que tumores de controle atingissem metade do tamanho alvo. A dose de um composto a qual proporcionou o efeito terapêutico máximo foi denominada a dose ótima (OD). Grupos de tratamento (tipicamente 8 camundongos) com mais de uma morte atribuível à toxicidade pelo fármaco foram considerados como tendo sido tratamentos excessivamente tóxicos e seus dados não foram usados na avaliação de atividade antitumor. A dose máxima tolerada (MTD) é definida como o nível de dose imediatamente abaixo do qual toxicidade excessiva (isto é, mais de uma morte) ocorreu. Os camundongos tratados que morreram antes de seus tumores terem atingido o tamanho alvo foram considerados como tendo morrido por toxicidade pelo fármaco. Avaliações estatísticas dos dados foram realizadas usando o teste de Wilcoxon generalizado de Gehan (Gehan, *Biometrika* 52: 203-223, 1965).

Análise de Western blot de 385A08-Fc

Células de rabdomiosarcoma humano Rh41 foram privadas de soro durante a noite na presença de BSA a 0,3%; elas foram, então, expostas a 385A08-Fc durante 1 hora a 37 °C após estimulação com IGF-I, IGF-II ou ligantes de insulina (50 ng/ml) durante 5 minutos antes de lise. As células foram submetidas à lise em tampão TTG (Tris-HCl a 20 mM, pH de 7,6, Triton X-100 a 1%, glicerol a 5%, NaCl a 0,15 M, EDTA a 1 mM, Complete Tablets e Coquetel Inibidor de Fosfatase). As concentrações de proteína dos lisatos de célula totais foram determinadas usando BSA como o padrão. Quantidades iguais de proteína de cada lisato foram carregadas em cada cavidade de um gel. As proteínas foram separadas através de SDS PAGE, transferidas para uma membrana de Nitrocelulose e bloqueadas em Tampão de Bloqueio Odyssey (Li-Cor Biosciences) durante a noite a 4°C. As membranas foram hibridizadas com anticorpos fosfo-específicos ao IGF-1R, Akt e MAPK durante 2 horas em temperatura ambiente e, então, lavadas 3 vezes em TBS com Tween-20 a 0,1%. Após lavagem, as membranas foram incubadas com anticorpos secundários fluorescentemente rotulados. A visualização de proteína foi realizada utilizando o Odyssey Infrared Imaging System (Li-Cor Biosciences), o qual permite detecção simultânea e independente de

5 sinais de fluorescência. Baseado em exploração densitométrica usando o sistema de formação de imagem Li-Cor Biosciences, a inibição foi calculada comparando a proporção de fosfossinais em amostras tratadas versus não-tratadas após normalização para actina ou GAPDH, os quais são usados como controles de carregamento.

Proliferação celular em Rh41 (rabdomiosarcoma humano e mieloma múltiplo humano H929)

10 A proliferação foi avaliada através de incorporação de [3H]-timidina em DNA após 72 horas de exposição aos reagentes. Células Rh41 foram colocadas em lâminas em uma densidade de 3500 e H929 a 8000 células/cavidade, respectivamente, em lâminas de microtitulação com 96 cavidades e 24 horas depois elas foram expostas a uma faixa de concentrações de fármaco. Após 72 horas de incubação a 37 °C, as células foram pul-
15 sadas com 4 µCi/ml de [3H] timidina (Amersham Pharmacia Biotech, Reino Unido) durante 3 horas, tripsinizadas, coletadas sobre lâminas UniFilter-96 GF/B (PerkinElmer, Boston, MA) e a cintilação foi medida sobre um Top-Count.NXT (Packard, CT). Os resultados são expressos como uma IC50, a qual é a concentração de fármaco requerida para inibir a proliferação celular em 50% daquela das células de controle não-tratadas. Os dados represen-
20 tam a média de cavidades em triplicata com os desvios padrões mostrados.

LISTAGEM DE SEQUÊNCIA

<110> ADNEXUS, A BRISTOL-MYERS SQUIBB R&D COMPANY

<120> PRODUTOS TERAPÊUTICOS OBJETIVADOS BASEADOS EM PROTEÍNAS MANIPULADAS PARA RECEPTORES DE QUÍNASES DE TIROSINA, INCLUINDO IGF-IR

5 <130> COTH-013-WO1

<140> PCT/US07/024316

<141> 2007-11-21

<150> 60/879.666

<151> 09/01/2007

10 <150> 60/860.605

<151> 22/11/2006

<160> 248

<170> PatentIn versão 3.3

<210> 1

15 <211> 94

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 1

Val Ser Asp Val Pro Arg Asp Leu Glu Val Val Ala Ala Thr Pro Thr

20 1 5 10 15

Ser Leu Leu Ile Ser Trp Asp Ala Pro Ala Val Thr Val Arg Tyr Tyr

20 25 30

Arg Ile Thr Tyr Gly Glu Thr Gly Gly Asn Ser Pro Val Gln Glu Phe

35 40 45

25 Thr Val Pro Gly Ser Lys Ser Thr Ala Thr Ile Ser Gly Leu Lys Pro

50 55 60

Gly Val Asp Tyr Thr Ile Thr Val Tyr Ala Val Thr Gly Arg Gly Asp

65 70 75 80

Ser Pro Ala Ser Ser Lys Pro Ile Ser Ile Asn Tyr Arg Thr

30 85 90

<210> 2

<211> 98

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Descrição de Sequência artificial: polipeptídeo sintético

5 <400> 2

Val Ser Asp Val Pro Arg Asp Leu Glu Val Val Ala Ala Thr Pro Thr

1 5 10 15

Ser Leu Leu Ile Ser Trp Arg Ala Arg Gln Asn Leu Ser Arg Tyr Tyr

20 25 30

10 Arg Ile Thr Tyr Gly Glu Thr Gly Gly Asn Ser Pro Val Gln Glu Phe

35 40 45

Thr Val Pro Val Leu Pro Asn Thr Ala Thr Ile Ser Gly Leu Lys Pro

50 55 60

Gly Val Asp Tyr Thr Ile Thr Val Tyr Ala Val Thr Val Gly Val Pro

15 65 70 75 80

Phe Tyr Asp Met Leu Ile Gly Leu Leu Tyr Pro Ile Ser Ile Asn Tyr

85 90 95

Arg Thr

<210> 3

20 <211> 98

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Descrição de Sequência artificial: polipeptídeo sintético

25 <400> 3

Val Ser Asp Val Pro Arg Asp Leu Glu Val Val Ala Ala Thr Pro Thr

1 5 10 15

Ser Leu Leu Ile Ser Trp Leu Pro Pro Gly Phe Val Ile Arg Tyr Tyr

20 25 30

30 Arg Ile Thr Tyr Gly Glu Thr Gly Gly Asn Ser Pro Val Gln Glu Phe

35 40 45

Thr Val Pro Ser Arg Leu Thr Thr Ala Thr Ile Ser Gly Leu Lys Pro

50 55 60
 Gly Val Asp Tyr Thr Ile Thr Val Tyr Ala Val Thr Ser Ser Asn Gly
 65 70 75 80
 Phe Tyr Ser Lys Ile Leu Ser Leu Trp Trp Pro Ile Ser Ile Asn Tyr
 5 85 90 95
 Arg Thr
 <210> 4
 <211> 96
 <212> PRT
 10 <213> Sequência artificial
 <220>
 <223> Descrição de Sequência artificial: polipeptídeo sintético
 <400> 4
 Val Ser Asp Val Pro Arg Asp Leu Glu Val Val Ala Ala Thr Pro Thr
 15 1 5 10 15
 Ser Leu Leu Ile Ser Trp Gly Pro His Val Leu Gly Ser Arg Tyr Tyr
 20 25 30
 Arg Ile Thr Tyr Gly Glu Thr Gly Gly Asn Ser Pro Val Gln Glu Phe
 35 40 45
 20 Thr Val Pro Pro Trp Glu Arg Thr Ala Thr Ile Ser Gly Leu Lys Pro
 50 55 60
 Gly Val Asp Tyr Thr Ile Thr Val Tyr Ala Val Thr Leu Arg Thr Gly
 65 70 75 80
 Leu Pro Thr Leu His Ser Pro Gly Pro Ile Ser Ile Asn Tyr Arg Thr
 25 85 90 95
 <210> 5
 <211> 91
 <212> PRT
 <213> Sequência artificial
 30 <220>
 <223> Descrição de Sequência artificial: polipeptídeo sintético
 <400> 5

Val Ser Asp Val Pro Arg Asp Leu Glu Val Val Ala Ala Thr Pro Thr
 1 5 10 15
 Ser Leu Leu Ile Ser Trp Ile Phe Ile Pro Ser Thr Trp Arg Tyr Tyr
 20 25 30
 5 Arg Ile Thr Tyr Gly Glu Thr Gly Gly Asn Ser Pro Val Gln Glu Phe
 35 40 45
 Thr Val Pro Thr Met Asp His Thr Ala Thr Ile Ser Gly Leu Lys Pro
 50 55 60
 Gly Val Asp Tyr Thr Ile Thr Val Tyr Ala Val Thr Leu Asp His Arg
 10 65 70 75 80
 Ser Leu Trp Pro Ile Ser Ile Asn Tyr Arg Thr
 85 90
 <210> 6
 <211> 94
 15 <212> PRT
 <213> Sequência artificial
 <220>
 <223> Descrição de Sequência artificial: polipeptídeo sintético
 <400> 6
 20 Val Ser Asp Val Pro Arg Asp Leu Glu Val Val Ala Ala Thr Pro Thr
 1 5 10 15
 Ser Leu Leu Ile Ser Trp Pro Thr His Tyr Lys Val Ala Arg Tyr Tyr
 20 25 30
 Arg Ile Thr Tyr Gly Glu Thr Gly Gly Asn Ser Pro Val Gln Glu Phe
 35 40 45
 25 Thr Val Pro Tyr His Asp His Thr Ala Thr Ile Ser Gly Leu Lys Pro
 50 55 60
 Gly Val Asp Tyr Thr Ile Thr Val Tyr Ala Val Thr Asp Tyr Lys Met
 65 70 75 80
 30 Lys Pro Arg Asn Tyr Gly Pro Ile Ser Ile Asn Tyr Arg Thr
 85 90
 <210> 7

<211> 94

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

5 <223> Descrição de Sequência artificial: polipeptídeo sintético

<400> 7

Val Ser Asp Val Pro Arg Asp Leu Glu Val Val Ala Ala Thr Pro Thr

1 5 10 15

Ser Leu Leu Ile Ser Trp Ser Tyr Glu Ser Tyr Lys Tyr Arg Tyr Tyr

10 20 25 30

Arg Ile Thr Tyr Gly Glu Thr Gly Gly Asn Ser Pro Val Gln Glu Phe

35 40 45

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

50 55 60

15 Gly Val Asp Tyr Thr Ile Thr Val Tyr Ala Val Thr Glu Lys Gly His

65 70 75 80

Tyr Arg Tyr Ile Tyr Ala Pro Ile Ser Ile Asn Tyr Arg Thr

85 90

<210> 8

20 <211> 90

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Descrição de Sequência artificial: polipeptídeo sintético

25 <400> 8

Val Ser Asp Val Pro Arg Asp Leu Glu Val Val Ala Ala Thr Pro Thr

1 5 10 15

Ser Leu Leu Ile Ser Trp Gly Ser His Leu Lys Val Lys Arg Tyr Tyr

20 25 30

30 Arg Ile Thr Tyr Gly Glu Thr Gly Gly Asn Ser Pro Val Gln Glu Phe

35 40 45

Thr Val Pro Phe Thr Ser Arg Thr Ala Thr Ile Ser Gly Leu Lys Pro

50 55 60
 Gly Val Asp Tyr Thr Ile Thr Val Tyr Ala Val Thr Lys Phe Arg Asn
 65 70 75 80
 Tyr Arg Pro Ile Ser Ile Asn Tyr Arg Thr
 5 85 90
 <210> 9
 <211> 90
 <212> PRT
 <213> Sequência artificial
 10 <220>
 <223> Descrição de Sequência artificial: polipeptídeo sintético
 <400> 9
 Val Ser Asp Val Pro Arg Asp Leu Glu Val Val Ala Ala Thr Pro Thr
 1 5 10 15
 15 Ser Leu Leu Ile Ser Trp Ala Pro Tyr Val Arg Val Ala Arg Tyr Tyr
 20 25 30
 Arg Ile Thr Tyr Gly Glu Thr Gly Gly Asn Ser Pro Val Gln Glu Phe
 35 40 45
 Thr Val Pro Thr Leu Ser Arg Thr Ala Thr Ile Ser Gly Leu Lys Pro
 20 50 55 60
 Gly Val Asp Tyr Thr Ile Thr Val Tyr Ala Val Thr Arg Thr Arg Asn
 65 70 75 80
 Tyr Gly Pro Ile Ser Ile Asn Tyr Arg Thr
 85 90
 25 <210> 10
 <211> 90
 <212> PRT
 <213> Sequência artificial
 <220>
 30 <223> Descrição de Sequência artificial: polipeptídeo sintético
 <400> 10
 Val Ser Asp Val Pro Arg Asp Leu Glu Val Val Ala Ala Thr Pro Thr

1 5 10 15
Ser Leu Leu Ile Ser Trp Gly Ser His Leu Lys Val Lys Arg Tyr Tyr
20 25 30
Arg Ile Thr Tyr Gly Glu Thr Gly Gly Asn Ser Pro Val Gln Glu Phe
5 35 40 45
Thr Val Pro Tyr Thr Ser Arg Thr Ala Thr Ile Ser Gly Leu Lys Pro
50 55 60
Gly Val Asp Tyr Thr Ile Thr Val Tyr Ala Val Thr Lys Ser Gln His
65 70 75 80
10 Ser Arg Pro Ile Ser Ile Asn Tyr Arg Thr
85 90
<210> 11
<211> 94
<212> PRT
15 <213> Sequência artificial
<220>
<223> Descrição de Sequência artificial: polipeptídeo sintético
<400> 11
Val Ser Asp Val Pro Arg Asp Leu Glu Val Val Ala Ala Thr Pro Thr
20 1 5 10 15
Ser Leu Leu Ile Ser Trp Ser Val Glu Ala Met Asp Gly Arg Tyr Tyr
20 25 30
Arg Ile Thr Tyr Gly Glu Thr Gly Gly Asn Ser Pro Val Gln Glu Phe
35 40 45
25 Thr Val Pro Glu Glu Pro Gly Thr Ala Thr Ile Ser Gly Leu Lys Pro
50 55 60
Gly Val Asp Tyr Thr Ile Thr Val Tyr Ala Val Thr Thr Lys Tyr Tyr
65 70 75 80
Tyr Leu Val Ile Glu Pro Pro Ile Ser Ile Asn Tyr Arg Thr
30 85 90
<210> 12
<211> 94

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Descrição de Sequência artificial: polipeptídeo sintético

5 <400> 12

Val Ser Asp Val Pro Arg Asp Leu Glu Val Val Ala Ala Thr Pro Thr

1 5 10 15

Ser Leu Leu Ile Ser Trp Asp Pro His Asn Gln Asp Pro Arg Tyr Tyr

20 25 30

10 Arg Ile Thr Tyr Gly Glu Thr Gly Gly Asn Ser Pro Val Gln Glu Phe

35 40 45

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

50 55 60

Gly Val Asp Tyr Thr Ile Thr Val Tyr Ala Val Thr Asp Lys Glu His

15 65 70 75 80

His Gln Tyr Leu Ile Asn Pro Ile Ser Ile Asn Tyr Arg Thr

85 90

<210> 13

<211> 98

20 <212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Descrição de Sequência artificial: polipeptídeo sintético

<400> 13

25 Val Ser Asp Val Pro Arg Asp Leu Glu Val Val Ala Ala Thr Pro Thr

1 5 10 15

Ser Leu Leu Ile Ser Trp Ile Gly Leu Asp Gly Leu Val Arg Tyr Tyr

20 25 30

Arg Ile Thr Tyr Gly Glu Thr Gly Gly Asn Ser Pro Val Gln Glu Phe

30 35 40 45

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

50 55 60

Gly Val Asp Tyr Thr Ile Thr Val Tyr Ala Val Thr Thr Asp Thr Gly
65 70 75 80
Phe Ile Ala Arg Leu Met Ser Leu Ile Tyr Pro Ile Ser Ile Asn Tyr
85 90 95

5 Arg Thr
<210> 14
<211> 94
<212> PRT
<213> Sequência artificial

10 <220>
<223> Descrição de Sequência artificial: polipeptídeo sintético
<400> 14
Val Ser Asp Val Pro Arg Asp Leu Glu Val Val Ala Ala Thr Pro Thr
1 5 10 15
15 Ser Leu Leu Ile Ser Trp Ile Tyr Val Leu His His Ile Arg Tyr Tyr
20 25 30
Arg Ile Thr Tyr Gly Glu Thr Gly Gly Asn Ser Pro Val Gln Glu Phe
35 40 45
Thr Val Pro Ser Gln His His Thr Ala Thr Ile Ser Gly Leu Lys Pro
20 50 55 60
Gly Val Asp Tyr Thr Ile Thr Val Tyr Ala Val Thr Glu Thr Arg Pro
65 70 75 80
Tyr Arg Tyr Leu Met Tyr Pro Ile Ser Ile Asn Tyr Arg Thr
85 90

25 <210> 15
<211> 94
<212> PRT
<213> Sequência artificial
<220>
30 <223> Descrição de Sequência artificial: polipeptídeo sintético
<400> 15
Val Ser Asp Val Pro Arg Asp Leu Glu Val Val Ala Ala Thr Pro Thr

1 5 10 15
 Ser Leu Leu Ile Ser Trp Pro Pro Tyr Leu Arg Val Ala Arg Tyr Tyr
 20 25 30
 Arg Ile Thr Tyr Gly Glu Thr Gly Gly Asn Ser Pro Val Gln Glu Phe
 5 35 40 45
 Thr Val Pro Ser Ser Ala Arg Thr Ala Thr Ile Ser Gly Leu Lys Pro
 50 55 60
 Gly Val Asp Tyr Thr Ile Thr Val Tyr Ala Val Thr Pro Ser Asn Ile
 65 70 75 80
 10 Ile Gly Arg His Tyr Gly Pro Ile Ser Ile Asn Tyr Arg Thr
 85 90
 <210> 16
 <211> 89
 <212> PRT
 15 <213> Sequência artificial
 <220>
 <223> Descrição de Sequência artificial: polipeptídeo sintético
 <400> 16
 Val Ser Asp Val Pro Arg Asp Leu Glu Val Val Ala Ala Thr Pro Thr
 20 1 5 10 15
 Ser Leu Leu Ile Ser Trp Gly Thr His Val Lys Val Pro Arg Tyr Tyr
 20 25 30
 Arg Ile Thr Tyr Gly Glu Thr Gly Gly Asn Ser Pro Val Gln Glu Phe
 35 40 45
 25 Thr Val Pro Tyr Ser Asp His Thr Ala Thr Ile Ser Gly Leu Lys Pro
 50 55 60
 Gly Val Asp Tyr Thr Ile Thr Val Tyr Ala Val Thr Asp Tyr Asp Tyr
 65 70 75 80
 Lys Pro Ile Ser Ile Asn Tyr Arg Thr
 30 85
 <210> 17
 <211> 94

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Descrição de Sequência artificial: polipeptídeo sintético

5 <400> 17

Val Ser Asp Val Pro Arg Asp Leu Glu Val Val Ala Ala Thr Pro Thr

1 5 10 15

Ser Leu Leu Ile Ser Trp Ser Pro Tyr Leu Arg Val Ala Arg Tyr Tyr

20 25 30

10 Arg Ile Thr Tyr Gly Glu Thr Gly Gly Asn Ser Pro Val Gln Glu Phe

35 40 45

Thr Val Pro Ser Ser Ala Arg Thr Ala Thr Ile Ser Gly Leu Lys Pro

50 55 60

Gly Val Asp Tyr Thr Ile Thr Val Tyr Ala Val Thr Pro Ser Asn Ile

15 65 70 75 80

Ile Gly Arg His Tyr Gly Pro Ile Ser Ile Asn Tyr Arg Thr

85 90

<210> 18

<211> 94

20 <212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Descrição de Sequência artificial: polipeptídeo sintético

<400> 18

25 Val Ser Asp Val Pro Arg Asp Leu Glu Val Val Ala Ala Thr Pro Thr

1 5 10 15

Ser Leu Leu Ile Ser Trp Glu Val Arg Tyr Tyr Pro Tyr Arg Tyr Tyr

20 25 30

Arg Ile Thr Tyr Gly Glu Thr Gly Gly Asn Ser Pro Val Gln Glu Phe

30 35 40 45

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

50 55 60

Gly Val Asp Tyr Thr Ile Thr Val Tyr Ala Val Thr Asp Tyr Lys Met
 65 70 75 80

Lys Pro Arg Asn Tyr Gly Pro Ile Ser Ile Asn Tyr Arg Thr
 85 90

5 <210> 19

<211> 92

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

10 <223> Descrição de Sequência artificial: polipeptídeo sintético

<400> 19

Val Ser Asp Val Pro Arg Asp Leu Glu Val Val Ala Ala Thr Pro Thr
 1 5 10 15

Ser Leu Leu Ile Ser Trp Thr Thr His Phe Thr Val Ser Arg Tyr Tyr
 15 20 25 30

Arg Ile Thr Tyr Gly Glu Thr Gly Gly Asn Ser Pro Val Gln Glu Phe
 35 40 45

Thr Val Pro Glu Val His Tyr Thr Ala Thr Ile Ser Gly Leu Lys Pro
 50 55 60

20 Gly Val Asp Tyr Thr Ile Thr Val Tyr Ala Val Thr His Arg Arg Arg
 65 70 75 80

Arg Arg Tyr His Pro Ile Ser Ile Asn Tyr Arg Thr
 85 90

<210> 20

25 <211> 94

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Descrição de Sequência artificial: polipeptídeo sintético

30 <400> 20

Val Ser Asp Val Pro Arg Asp Leu Glu Val Val Ala Ala Thr Pro Thr
 1 5 10 15

Ser Leu Leu Ile Ser Trp Asp His Asp Met Pro Gly Gly Arg Tyr Tyr
 20 25 30
 Arg Ile Thr Tyr Gly Glu Thr Gly Gly Asn Ser Pro Val Gln Glu Phe
 35 40 45
 5 Thr Val Pro Ser Ser Tyr Pro Thr Ala Thr Ile Ser Gly Leu Lys Pro
 50 55 60
 Gly Val Asp Tyr Thr Ile Thr Val Tyr Ala Val Thr Tyr Ser Tyr Leu
 65 70 75 80
 Tyr Gln Tyr Asn His Ala Pro Ile Ser Ile Asn Tyr Arg Thr
 10 85 90
 <210> 21
 <211> 94
 <212> PRT
 <213> Sequência artificial
 15 <220>
 <223> Descrição de Sequência artificial: polipeptídeo sintético
 <400> 21
 Val Ser Asp Val Pro Arg Asp Leu Glu Val Val Ala Ala Thr Pro Thr
 1 5 10 15
 20 Ser Leu Leu Ile Ser Trp Tyr Asn Asp Pro Arg Arg Asn Arg Tyr Tyr
 20 25 30
 Arg Ile Thr Tyr Gly Glu Thr Gly Gly Asn Ser Pro Val Gln Glu Phe
 35 40 45
 Thr Val Pro Ala Tyr Tyr Pro Thr Ala Thr Ile Ser Gly Leu Lys Pro
 50 55 60
 25 Gly Val Asp Tyr Thr Ile Thr Val Tyr Ala Val Thr Gln Thr Asn Met
 65 70 75 80
 His Tyr Leu Met His Tyr Pro Ile Ser Ile Asn Tyr Arg Thr
 85 90
 30 <210> 22
 <211> 90
 <212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Descrição de Sequência artificial: polipeptídeo sintético

<400> 22

5 Val Ser Asp Val Pro Arg Asp Leu Glu Val Val Ala Ala Thr Pro Thr
 1 5 10 15
 Ser Leu Leu Ile Ser Trp Gly Ser Lys Leu Leu Val Gln Arg Tyr Tyr
 20 25 30
 Arg Ile Thr Tyr Gly Glu Thr Gly Gly Asn Ser Pro Val Gln Glu Phe
 10 35 40 45
 Thr Val Pro Arg Leu Ala Lys Thr Ala Thr Ile Ser Gly Leu Lys Pro
 50 55 60
 Gly Val Asp Tyr Thr Ile Thr Val Tyr Ala Val Thr Lys Met Arg Asp
 65 70 75 80
 15 Tyr Arg Pro Ile Ser Ile Asn Tyr Arg Thr
 85 90

<210> 23

<211> 94

<212> PRT

20 <213> Sequência artificial

<220>

<223> Descrição de Sequência artificial: polipeptídeo sintético

<400> 23

25 Val Ser Asp Val Pro Arg Asp Leu Glu Val Val Ala Ala Thr Pro Thr
 1 5 10 15
 Ser Leu Leu Ile Ser Trp Ile Tyr Arg Ser Tyr Lys Arg Arg Tyr Tyr
 20 25 30
 Arg Ile Thr Tyr Gly Glu Thr Gly Gly Asn Ser Pro Val Gln Glu Phe
 35 40 45
 30 Thr Val Pro Ser Asn Tyr Pro Thr Ala Thr Ile Ser Gly Leu Lys Pro
 50 55 60
 Gly Val Asp Tyr Thr Ile Thr Val Tyr Ala Val Thr Gln Gln Tyr Ser

65 70 75 80

Ser Pro Thr Tyr Ser His Pro Ile Ser Ile Asn Tyr Arg Thr

85 90

<210> 24

5 <211> 94

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Descrição de Sequência artificial: polipeptídeo sintético

10 <400> 24

Val Ser Asp Val Pro Arg Asp Leu Glu Val Val Ala Ala Thr Pro Thr

1 5 10 15

Ser Leu Leu Ile Ser Trp Ser Pro Tyr Leu Arg Val Ala Arg Tyr Tyr

20 25 30

15 Arg Ile Thr Tyr Gly Glu Thr Gly Gly Asn Ser Pro Val Gln Glu Phe

35 40 45

Thr Val Pro Ser Ala Ala Arg Thr Ala Thr Ile Ser Gly Leu Lys Pro

50 55 60

Gly Val Asp Tyr Thr Ile Thr Val Tyr Ala Val Thr Ala Ser Leu Ile

20 65 70 75 80

Ile Gly Arg His Tyr Gly Pro Ile Ser Ile Asn Tyr Arg Thr

85 90

<210> 25

<211> 94

25 <212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Descrição de Sequência artificial: polipeptídeo sintético

<400> 25

30 Val Ser Asp Val Pro Arg Asp Leu Glu Val Val Ala Ala Thr Pro Thr

1 5 10 15

Ser Leu Leu Ile Ser Trp Asn His Thr Leu Lys Val Gln Arg Tyr Tyr

20 25 30
 Arg Ile Thr Tyr Gly Glu Thr Gly Gly Asn Ser Pro Val Gln Glu Phe
 35 40 45
 Thr Val Pro Tyr Thr His Ser Thr Ala Thr Ile Ser Gly Leu Lys Pro
 5 50 55 60
 Gly Val Asp Tyr Thr Ile Thr Val Tyr Ala Val Thr Glu Arg Glu Ser
 65 70 75 80
 Tyr Arg Tyr Met His Ile Pro Ile Ser Ile Asn Tyr Arg Thr
 85 90
 10 <210> 26
 <211> 94
 <212> PRT
 <213> Sequência artificial
 <220>
 15 <223> Descrição de Sequência artificial: polipeptídeo sintético
 <400> 26
 Val Ser Asp Val Pro Arg Asp Leu Glu Val Val Ala Ala Thr Pro Thr
 1 5 10 15
 Ser Leu Leu Ile Ser Trp Ser Asp Thr Leu Arg Val Lys Arg Tyr Tyr
 20 20 25 30
 Arg Ile Thr Tyr Gly Glu Thr Gly Gly Asn Ser Pro Val Gln Glu Phe
 35 40 45
 Thr Val Pro Tyr His Ser Gln Thr Ala Thr Ile Ser Gly Leu Lys Pro
 50 55 60
 25 Gly Val Asp Tyr Thr Ile Thr Val Tyr Ala Val Thr Pro Ser Met Met
 65 70 75 80
 Asn Tyr Arg Asn Tyr Gly Pro Ile Ser Ile Asn Tyr Arg Thr
 85 90
 <210> 27
 30 <211> 92
 <212> PRT
 <213> Sequência artificial

<220>

<223> Descrição de Sequência artificial: polipeptídeo sintético

<400> 27

Val Ser Asp Val Pro Arg Asp Leu Glu Val Val Ala Ala Thr Pro Thr

5 1 5 10 15

Ser Leu Leu Ile Ser Trp Asp Asn Ser Phe Val Val Gln Arg Tyr Tyr

20 25 30

Arg Ile Thr Tyr Gly Glu Thr Gly Gly Asn Ser Pro Val Gln Glu Phe

35 40 45

10 Thr Val Pro Arg Tyr Ala Arg Thr Ala Thr Ile Ser Gly Leu Lys Pro

50 55 60

Gly Val Asp Tyr Thr Ile Thr Val Tyr Ala Val Thr Ala Leu Asn Pro

65 70 75 80

Arg Ala Tyr Arg Pro Ile Ser Ile Asn Tyr Arg Thr

15 85 90

<210> 28

<211> 90

<212> PRT

<213> Sequência artificial

20 <220>

<223> Descrição de Sequência artificial: polipeptídeo sintético

<400> 28

Val Ser Asp Val Pro Arg Asp Leu Glu Val Val Ala Ala Thr Pro Thr

1 5 10 15

25 Ser Leu Leu Ile Ser Trp Ser Ser Arg Leu Ile Val Arg Arg Tyr Tyr

20 25 30

Arg Ile Thr Tyr Gly Glu Thr Gly Gly Asn Ser Pro Val Gln Glu Phe

35 40 45

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

30 50 55 60

Gly Val Asp Tyr Thr Ile Thr Val Tyr Ala Val Thr Lys Met Arg Asp

65 70 75 80

Tyr Arg Pro Ile Ser Ile Asn Tyr Arg Thr

85

90

<210> 29

<211> 92

5 <212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Descrição de Sequência artificial: polipeptídeo sintético

<400> 29

10 Val Ser Asp Val Pro Arg Asp Leu Glu Val Val Ala Ala Thr Pro Thr

1

5

10

15

Ser Leu Leu Ile Ser Trp Ser Ser Arg Leu Ile Val Arg Arg Tyr Tyr

20

25

30

Arg Ile Thr Tyr Gly Glu Thr Gly Gly Asn Ser Pro Val Gln Glu Phe

15

35

40

45

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

50

55

60

Gly Val Asp Tyr Thr Ile Thr Val Tyr Ala Val Thr His Thr Arg Pro

65

70

75

80

20 Arg Asn Tyr Gln Pro Ile Ser Ile Asn Tyr Arg Thr

85

90

<210> 30

<211> 92

<212> PRT

25 <213> Sequência artificial

<220>

<223> Descrição de Sequência artificial: polipeptídeo sintético

<400> 30

Val Ser Asp Val Pro Arg Asp Leu Glu Val Val Ala Ala Thr Pro Thr

30

1

5

10

15

Ser Leu Leu Ile Ser Trp Gly Thr Arg Leu Arg Val Ser Arg Tyr Tyr

20

25

30

Arg Ile Thr Tyr Gly Glu Thr Gly Gly Asn Ser Pro Val Gln Glu Phe

35

40

45

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

50

55

60

5 Gly Val Asp Tyr Thr Ile Thr Val Tyr Ala Val Thr Leu Asn Ser Leu

65

70

75

80

Arg Arg Tyr Gly Pro Ile Ser Ile Asn Tyr Arg Thr

85

90

<210> 31

10 <211> 94

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Descrição de Sequência artificial: polipeptídeo sintético

15 <400> 31

Val Ser Asp Val Pro Arg Asp Leu Glu Val Val Ala Ala Thr Pro Thr

1

5

10

15

Ser Leu Leu Ile Ser Trp Glu Tyr Asp Arg Pro Ala Gly Arg Tyr Tyr

20

25

30

20 Arg Ile Thr Tyr Gly Glu Thr Gly Gly Asn Ser Pro Val Gln Glu Phe

35

40

45

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

50

55

60

Gly Val Asp Tyr Thr Ile Thr Val Tyr Ala Val Thr Gln Thr Asn Met

25 65

70

75

80

His Tyr Leu Met His Tyr Pro Ile Ser Ile Asn Tyr Arg Thr

85

90

<210> 32

<211> 90

30 <212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Descrição de Sequência artificial: polipeptídeo sintético

<400> 32

Val Ser Asp Val Pro Arg Asp Leu Glu Val Val Ala Ala Thr Pro Thr

1 5 10 15

5 Ser Leu Leu Ile Ser Trp Ser Thr His Phe Thr Val Ser Arg Tyr Tyr

20 25 30

Arg Ile Thr Tyr Gly Glu Thr Gly Gly Asn Ser Pro Val Gln Glu Phe

35 40 45

Thr Val Pro Lys Val Asn Tyr Thr Ala Thr Ile Ser Gly Leu Lys Pro

10 50 55 60

Gly Val Asp Tyr Thr Ile Thr Val Tyr Ala Val Thr Arg Thr Arg Asn

65 70 75 80

Tyr Gly Pro Ile Ser Ile Asn Tyr Arg Thr

85 90

15 <210> 33

<211> 94

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

20 <223> Descrição de Sequência artificial: polipeptídeo sintético

<400> 33

Val Ser Asp Val Pro Arg Asp Leu Glu Val Val Ala Ala Thr Pro Thr

1 5 10 15

Ser Leu Leu Ile Ser Trp Asp Lys His Ala Tyr Tyr Gln Arg Tyr Tyr

25 20 25 30

Arg Ile Thr Tyr Gly Glu Thr Gly Gly Asn Ser Pro Val Gln Glu Phe

35 40 45

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

50 55 60

30 Gly Val Asp Tyr Thr Ile Thr Val Tyr Ala Val Thr Asp Arg Thr His

65 70 75 80

Ser Arg Ile Tyr His Arg Pro Ile Ser Ile Asn Tyr Arg Thr

85 90

<210> 34

<211> 94

<212> PRT

5 <213> Sequência artificial

<220>

<223> Descrição de Sequência artificial: polipeptídeo sintético

<400> 34

Val Ser Asp Val Pro Arg Asp Leu Glu Val Val Ala Ala Thr Pro Thr

10 1 5 10 15

Ser Leu Leu Ile Ser Trp Pro Asn Asn Thr Ser Arg Gly Arg Tyr Tyr

20 25 30

Arg Ile Thr Tyr Gly Glu Thr Gly Gly Asn Ser Pro Val Gln Glu Phe

35 40 45

15 Thr Val Pro Ala Ser Tyr Pro Thr Ala Thr Ile Ser Gly Leu Lys Pro

50 55 60

Gly Val Asp Tyr Thr Ile Thr Val Tyr Ala Val Thr Glu Arg Val Ala

65 70 75 80

Tyr Arg Tyr Met His Lys Pro Ile Ser Ile Asn Tyr Arg Thr

20 85 90

<210> 35

<211> 94

<212> PRT

<213> Sequência artificial

25 <220>

<223> Descrição de Sequência artificial: polipeptídeo sintético

<400> 35

Val Ser Asp Val Pro Arg Asp Leu Glu Val Val Ala Ala Thr Pro Thr

1 5 10 15

30 Ser Leu Leu Ile Ser Trp Ser His Arg Leu Arg Val Lys Arg Tyr Tyr

20 25 30

Arg Ile Thr Tyr Gly Glu Thr Gly Gly Asn Ser Pro Val Gln Glu Phe

35 40 45
 Thr Val Pro Ser His Tyr Gln Thr Ala Thr Ile Ser Gly Leu Lys Pro
 50 55 60
 Gly Val Asp Tyr Thr Ile Thr Val Tyr Ala Val Thr Glu Lys Thr Ser
 5 65 70 75 80
 Tyr Arg Ile Met His Ser Pro Ile Ser Ile Asn Tyr Arg Thr
 85 90
 <210> 36
 <211> 94
 10 <212> PRT
 <213> Sequência artificial
 <220>
 <223> Descrição de Sequência artificial: polipeptídeo sintético
 <400> 36
 15 Val Ser Asp Val Pro Arg Asp Leu Glu Val Val Ala Ala Thr Pro Thr
 1 5 10 15
 Ser Leu Leu Ile Ser Trp Glu Tyr Asp Gly Thr Ala Gly Arg Tyr Tyr
 20 25 30
 Arg Ile Thr Tyr Gly Glu Thr Gly Gly Asn Ser Pro Val Gln Glu Phe
 20 35 40 45
 Thr Val Pro Ser Ser Tyr Pro Thr Ala Thr Ile Ser Gly Leu Lys Pro
 50 55 60
 Gly Val Asp Tyr Thr Ile Thr Val Tyr Ala Val Thr Tyr Ser Tyr Leu
 65 70 75 80
 25 Tyr Gln Tyr Asn His Ala Pro Ile Ser Ile Asn Tyr Arg Thr
 85 90
 <210> 37
 <211> 94
 <212> PRT
 30 <213> Sequência artificial
 <220>
 <223> Descrição de Sequência artificial: polipeptídeo sintético

<400> 37

Val Ser Asp Val Pro Arg Asp Leu Glu Val Val Ala Ala Thr Pro Thr

1 5 10 15

Ser Leu Leu Ile Ser Trp Ser His Arg Leu Arg Val Lys Arg Tyr Tyr

5 20 25 30

Arg Ile Thr Tyr Gly Glu Thr Gly Gly Asn Ser Pro Val Gln Glu Phe

35 40 45

Thr Val Pro Ser His Tyr Gln Thr Ala Thr Ile Ser Gly Leu Lys Pro

50 55 60

10 Gly Val Asp Tyr Thr Ile Thr Val Tyr Ala Val Thr Pro Ala Val Tyr

65 70 75 80

Tyr Ser Tyr Asn Tyr Gly Pro Ile Ser Ile Asn Tyr Arg Thr

85 90

<210> 38

15 <211> 93

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Descrição de Sequência artificial: polipeptídeo sintético

20 <400> 38

Val Ser Asp Val Pro Arg Asp Leu Glu Val Val Ala Ala Thr Pro Thr

1 5 10 15

Ser Leu Leu Ile Ser Trp Asn His Thr Leu Lys Val Gln Arg Tyr Tyr

20 25 30

25 Arg Ile Thr Tyr Gly Glu Thr Gly Gly Asn Ser Pro Val Gln Glu Phe

35 40 45

Thr Val Pro Tyr Thr His Ser Thr Ala Thr Ile Ser Gly Leu Lys Pro

50 55 60

Gly Val Asp Tyr Thr Ile Thr Val Tyr Ala Val Thr Asn Tyr Lys Gly

30 65 70 75 80

Pro Arg Gly Tyr Gly Pro Ile Ser Ile Asn Tyr Arg Thr

85 90

<210> 39

<211> 94

<212> PRT

<213> Sequência artificial

5 <220>

<223> Descrição de Sequência artificial: polipeptídeo sintético

<400> 39

Val Ser Asp Val Pro Arg Asp Leu Glu Val Val Ala Ala Thr Pro Thr
1 5 10 15

10 Ser Leu Leu Ile Ser Trp Ser Asp Val Phe Pro Ala Tyr Arg Tyr Tyr
20 25 30

Arg Ile Thr Tyr Gly Glu Thr Gly Gly Asn Ser Pro Val Gln Glu Phe
35 40 45

15 Thr Val Pro Ala His Ser Pro Thr Ala Thr Ile Ser Gly Leu Lys Pro
50 55 60

Gly Val Asp Tyr Thr Ile Thr Val Tyr Ala Val Thr Pro Ser Met Met
65 70 75 80

Asn Tyr Arg Asn Tyr Gly Pro Ile Ser Ile Asn Tyr Arg Thr
85 90

20 <210> 40

<211> 90

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

25 <223> Descrição de Sequência artificial: polipeptídeo sintético

<400> 40

Val Ser Asp Val Pro Arg Asp Leu Glu Val Val Ala Ala Thr Pro Thr
1 5 10 15

30 Ser Leu Leu Ile Ser Trp Asp Asn Asn Phe Leu Val Gln Arg Tyr Tyr
20 25 30

Arg Ile Thr Tyr Gly Glu Thr Gly Gly Asn Ser Pro Val Gln Glu Phe
35 40 45

Thr Val Pro Arg Tyr Ala His Thr Ala Thr Ile Ser Gly Leu Lys Pro
 50 55 60
 Gly Val Asp Tyr Thr Ile Thr Val Tyr Ala Val Thr Lys Met Arg Asp
 65 70 75 80
 5 Tyr Arg Pro Ile Ser Ile Asn Tyr Arg Thr
 85 90
 <210> 41
 <211> 94
 <212> PRT
 10 <213> Sequência artificial
 <220>
 <223> Descrição de Sequência artificial: polipeptídeo sintético
 <400> 41
 Val Ser Asp Val Pro Arg Asp Leu Glu Val Val Ala Ala Thr Pro Thr
 15 1 5 10 15
 Ser Leu Leu Ile Ser Trp Pro Phe Gln Ala Val Ser Asn Arg Tyr Tyr
 20 25 30
 Arg Ile Thr Tyr Gly Glu Thr Gly Gly Asn Ser Pro Val Gln Glu Phe
 35 40 45
 20 Thr Val Pro Ala Tyr Pro Asn Thr Ala Thr Ile Ser Gly Leu Lys Pro
 50 55 60
 Gly Val Asp Tyr Thr Ile Thr Val Tyr Ala Val Thr Tyr Met Ser Gly
 65 70 75 80
 His Arg Leu Leu His Ala Pro Ile Ser Ile Asn Tyr Arg Thr
 25 85 90
 <210> 42
 <211> 94
 <212> PRT
 <213> Sequência artificial
 30 <220>
 <223> Descrição de Sequência artificial: polipeptídeo sintético
 <400> 42

Val Ser Asp Val Pro Arg Asp Leu Glu Val Val Ala Ala Thr Pro Thr
 1 5 10 15
 Ser Leu Leu Ile Ser Trp Tyr Pro Ser Leu Ile Leu Glu Arg Tyr Tyr
 20 25 30
 5 Arg Ile Thr Tyr Gly Glu Thr Gly Gly Asn Ser Pro Val Gln Glu Phe
 35 40 45
 Thr Val Pro Asp Leu Arg Leu Thr Ala Thr Ile Ser Gly Leu Lys Pro
 50 55 60
 Gly Val Asp Tyr Thr Ile Thr Val Tyr Ala Val Thr Asp Lys Lys Ser
 10 65 70 75 80
 Tyr Arg Tyr Tyr His Ala Pro Ile Ser Ile Asn Tyr Arg Thr
 85 90
 <210> 43
 <211> 94
 15 <212> PRT
 <213> Sequência artificial
 <220>
 <223> Descrição de Sequência artificial: polipeptídeo sintético
 <400> 43
 20 Val Ser Asp Val Pro Arg Asp Leu Glu Val Val Ala Ala Thr Pro Thr
 1 5 10 15
 Ser Leu Leu Ile Ser Trp Tyr Asn Asp Pro Arg Arg Asn Arg Tyr Tyr
 20 25 30
 Arg Ile Thr Tyr Gly Glu Thr Gly Gly Asn Ser Pro Val Gln Glu Phe
 25 35 40 45
 Thr Val Pro Ala Tyr Tyr Pro Thr Ala Thr Ile Ser Gly Leu Lys Pro
 50 55 60
 Gly Val Asp Tyr Thr Ile Thr Val Tyr Ala Val Thr Ile Lys Gly Ile
 65 70 75 80
 30 Tyr Gln Tyr Thr Tyr His Pro Ile Ser Ile Asn Tyr Arg Thr
 85 90
 <210> 44

<211> 94
 <212> PRT
 <213> Sequência artificial
 <220>
 5 <223> Descrição de Sequência artificial: polipeptídeo sintético
 <400> 44
 Val Ser Asp Val Pro Arg Asp Leu Glu Val Val Ala Ala Thr Pro Thr
 1 5 10 15
 Ser Leu Leu Ile Ser Trp Tyr Asn Asp Pro Arg Arg Asn Arg Tyr Tyr
 10 20 25 30
 Arg Ile Thr Tyr Gly Glu Thr Gly Gly Asn Ser Pro Val Gln Glu Phe
 35 40 45
 Thr Val Pro Ser Ser Tyr Pro Thr Ala Thr Ile Ser Gly Leu Lys Pro
 50 55 60
 15 Gly Val Asp Tyr Thr Ile Thr Val Tyr Ala Val Thr Tyr Ser Tyr Leu
 65 70 75 80
 Tyr Gln Tyr Asn His Ala Pro Ile Ser Ile Asn Tyr Arg Thr
 85 90
 <210> 45
 20 <211> 94
 <212> PRT
 <213> Sequência artificial
 <220>
 <223> Descrição de Sequência artificial: polipeptídeo sintético
 25 <400> 45
 Val Ser Asp Val Pro Arg Asp Leu Glu Val Val Ala Ala Thr Pro Thr
 1 5 10 15
 Ser Leu Leu Ile Ser Trp Gln Tyr Asn Thr Ser Arg Gly Arg Tyr Tyr
 20 25 30
 30 Arg Ile Thr Tyr Gly Glu Thr Gly Gly Asn Ser Pro Val Gln Glu Phe
 35 40 45
 Thr Val Pro Ala Ser Tyr Pro Thr Ala Thr Ile Ser Gly Leu Lys Pro

50 55 60
 Gly Val Asp Tyr Thr Ile Thr Val Tyr Ala Val Thr Glu Arg Val Ala
 65 70 75 80
 Tyr Arg Tyr Met His Lys Pro Ile Ser Ile Asn Tyr Arg Thr
 5 85 90
 <210> 46
 <211> 92
 <212> PRT
 <213> Sequência artificial
 10 <220>
 <223> Descrição de Sequência artificial: polipeptídeo sintético
 <400> 46
 Val Ser Asp Val Pro Arg Asp Leu Glu Val Val Ala Ala Thr Pro Thr
 1 5 10 15
 15 Ser Leu Leu Ile Ser Trp Pro Val His Arg Val Val Gln Arg Tyr Tyr
 20 25 30
 Arg Ile Thr Tyr Gly Glu Thr Gly Gly Asn Ser Pro Val Gln Glu Phe
 35 40 45
 Thr Val Pro Ala Gly Gln Phe Thr Ala Thr Ile Ser Gly Leu Lys Pro
 20 50 55 60
 Gly Val Asp Tyr Thr Ile Thr Val Tyr Ala Val Thr Leu Gly Lys Phe
 65 70 75 80
 Arg Ser Tyr Leu Pro Ile Ser Ile Asn Tyr Arg Thr
 85 90
 25 <210> 47
 <211> 94
 <212> PRT
 <213> Sequência artificial
 <220>
 30 <223> Descrição de Sequência artificial: polipeptídeo sintético
 <400> 47
 Val Ser Asp Val Pro Arg Asp Leu Glu Val Val Ala Ala Thr Pro Thr

1 5 10 15
 Ser Leu Leu Ile Ser Trp Ser Tyr Asn Met Lys Pro His Arg Tyr Tyr
 20 25 30
 Arg Ile Thr Tyr Gly Glu Thr Gly Gly Asn Ser Pro Val Gln Glu Phe
 5 35 40 45
 Thr Val Pro Ser Ser Tyr Pro Thr Ala Thr Ile Ser Gly Leu Lys Pro
 50 55 60
 Gly Val Asp Tyr Thr Ile Thr Val Tyr Ala Val Thr Asp Arg Tyr Met
 65 70 75 80
 10 Tyr Arg Met Leu His Lys Pro Ile Ser Ile Asn Tyr Arg Thr
 85 90
 <210> 48
 <211> 92
 <212> PRT
 15 <213> Sequência artificial
 <220>
 <223> Descrição de Sequência artificial: polipeptídeo sintético
 <400> 48
 Val Ser Asp Val Pro Arg Asp Leu Glu Val Val Ala Ala Thr Pro Thr
 20 1 5 10 15
 Ser Leu Leu Ile Ser Trp Gly Thr Arg Leu Arg Val Ser Arg Tyr Tyr
 20 25 30
 Arg Ile Thr Tyr Gly Glu Thr Gly Gly Asn Ser Pro Val Gln Glu Phe
 35 40 45
 25 Thr Val Pro Arg Ser Val Glu Thr Ala Thr Ile Ser Gly Leu Lys Pro
 50 55 60
 Gly Val Asp Tyr Thr Ile Thr Val Tyr Ala Val Thr Leu Asn Ser Leu
 65 70 75 80
 Arg Arg Tyr Gly Pro Ile Ser Ile Asn Tyr Arg Thr
 30 85 90
 <210> 49
 <211> 90

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Descrição da Sequência Artificial

5 Polipeptídeo Sintético

<400> 49

Val Ser Asp Val Pro Arg Asp Leu Glu Val Val Ala Ala Thr Pro Thr
1 5 10 15

Ser Leu Leu Ile Ser Trp Gly Thr Val Arg Arg Val Ala Arg Tyr Tyr
10 20 25 30

Arg Ile Thr Tyr Gly Glu Thr Gly Gly Asn Ser Pro Val Gln Glu Phe
35 40 45

Thr Val Pro Ala Leu Gly Thr Thr Ala Thr Ile Ser Gly Leu Lys Pro
50 55 60

15 Gly Val Asp Tyr Thr Ile Thr Val Tyr Ala Val Thr Arg Thr Arg Asn
65 70 75 80

Tyr Gly Pro Ile Ser Ile Asn Tyr Arg Thr
85 90

<210> 50

20 <211> 94

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Descrição de Sequência artificial: polipeptídeo sintético

25 <400> 50

Val Ser Asp Val Pro Arg Asp Leu Glu Val Val Ala Ala Thr Pro Thr
1 5 10 15

Ser Leu Leu Ile Ser Trp Tyr Leu Asp Thr Thr Arg Asp Arg Tyr Tyr
20 25 30

30 Arg Ile Thr Tyr Gly Glu Thr Gly Gly Asn Ser Pro Val Gln Glu Phe
35 40 45

Thr Val Pro Pro Tyr Pro Met Thr Ala Thr Ile Ser Gly Leu Lys Pro

50 55 60

Gly Val Asp Tyr Thr Ile Thr Val Tyr Ala Val Thr Glu Ser Ile Gln
65 70 75 80

Tyr Arg Arg Ile His Arg Pro Ile Ser Ile Asn Tyr Arg Thr

5 85 90

<210> 51
<211> 90
<212> PRT
<213> Sequência artificial

10 <220>
<223> Descrição de Sequência artificial: polipeptídeo sintético
<400> 51

Val Ser Asp Val Pro Arg Asp Leu Glu Val Val Ala Ala Thr Pro Thr
1 5 10 15

15 Ser Leu Leu Ile Ser Trp Ala Pro Tyr Val Arg Val Ala Arg Tyr Tyr
20 25 30

Arg Ile Thr Tyr Gly Glu Thr Gly Gly Asn Ser Pro Val Gln Glu Phe
35 40 45

Thr Val Pro Thr Leu Ser Arg Thr Ala Thr Ile Ser Gly Leu Lys Pro

20 50 55 60

Gly Val Asp Tyr Thr Ile Thr Val Tyr Ala Val Thr Arg Thr Arg Asn
65 70 75 80

Tyr Gly Pro Ile Ser Ile Asn Tyr Arg Thr

85 90

25 <210> 52
<211> 94
<212> PRT
<213> Sequência artificial
<220>

30 <223> Descrição de Sequência artificial: polipeptídeo sintético
<400> 52

Val Ser Asp Val Pro Arg Asp Leu Glu Val Val Ala Ala Thr Pro Thr

1 5 10 15
 Ser Leu Leu Ile Ser Trp Tyr Ser Glu His Asp Tyr Tyr Arg Tyr Tyr
 20 25 30
 Arg Ile Thr Tyr Gly Glu Thr Gly Gly Asn Ser Pro Val Gln Glu Phe
 5 35 40 45
 Thr Val Pro His Asn Tyr Pro Thr Ala Thr Ile Ser Gly Leu Lys Pro
 50 55 60
 Gly Val Asp Tyr Thr Ile Thr Val Tyr Ala Val Thr Asp His Gly Gln
 65 70 75 80
 10 Tyr Arg Lys Met His Ser Pro Ile Ser Ile Asn Tyr Arg Thr
 85 90
 <210> 53
 <211> 94
 <212> PRT
 15 <213> Sequência artificial
 <220>
 <223> Descrição de Sequência artificial: polipeptídeo sintético
 <400> 53
 Val Ser Asp Val Pro Arg Asp Leu Glu Val Val Ala Ala Thr Pro Thr
 20 1 5 10 15
 Ser Leu Leu Ile Ser Trp Val Gln Glu Phe Thr Val Pro Arg Tyr Tyr
 20 25 30
 Arg Ile Thr Tyr Gly Glu Thr Gly Gly Asn Ser Pro Val Gln Glu Phe
 35 40 45
 25 Thr Val Pro Ala Tyr Tyr Pro Thr Ala Thr Ile Ser Gly Leu Lys Pro
 50 55 60
 Gly Val Asp Tyr Thr Ile Thr Val Tyr Ala Val Thr Gln Thr Asn Met
 65 70 75 80
 His Tyr Leu Met His Tyr Pro Ile Ser Ile Asn Tyr Arg Thr
 30 85 90
 <210> 54
 <211> 92

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Descrição de Sequência artificial: polipeptídeo sintético

5 <400> 54

Val Ser Asp Val Pro Arg Asp Leu Glu Val Val Ala Ala Thr Pro Thr

1 5 10 15

Ser Leu Leu Ile Ser Trp Gly Arg Val Ser Lys His Arg Arg Tyr Tyr

20 25 30

10 Arg Ile Thr Tyr Gly Glu Thr Gly Gly Asn Ser Pro Val Gln Glu Phe

35 40 45

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

50 55 60

Gly Val Asp Tyr Thr Ile Thr Val Tyr Ala Val Thr Arg Glu Ala Pro

15 65 70 75 80

Thr Gly Ile Arg Pro Ile Ser Ile Asn Tyr Arg Thr

85 90

<210> 55

<211> 88

20 <212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Descrição de Sequência artificial: polipeptídeo sintético

<400> 55

25 Val Ser Asp Val Pro Arg Asp Leu Glu Val Val Ala Ala Thr Pro Thr

1 5 10 15

Ser Leu Leu Ile Ser Trp Lys Lys Tyr Tyr His Met Asp Arg Tyr Tyr

20 25 30

Arg Ile Thr Tyr Gly Glu Thr Gly Gly Asn Ser Pro Val Gln Glu Phe

30 35 40 45

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

50 55 60

Gly Val Asp Tyr Thr Ile Thr Val Tyr Ala Val Thr Tyr Asp Gly Ile
65 70 75 80

Pro Ile Ser Ile Asn Tyr Arg Thr
85

5 <210> 56
<211> 94
<212> PRT
<213> Sequência artificial
<220>

10 <223> Descrição de Sequência artificial: polipeptídeo sintético
<400> 56

Val Ser Asp Val Pro Arg Asp Leu Glu Val Val Ala Ala Thr Pro Thr
1 5 10 15

Ser Leu Leu Ile Ser Trp Val Asn Asp Pro Gln Arg Asn Arg Tyr Tyr
15 20 25 30

Arg Ile Thr Tyr Gly Glu Thr Gly Gly Asn Ser Pro Val Gln Glu Phe
35 40 45

Thr Val Pro Ala Tyr Tyr Pro Thr Ala Thr Ile Ser Gly Leu Lys Pro
50 55 60

20 Gly Val Asp Tyr Thr Ile Thr Val Tyr Ala Val Thr Tyr Ser His Ile
65 70 75 80

Lys Tyr Leu Tyr His Lys Pro Ile Ser Ile Asn Tyr Arg Thr
85 90

<210> 57

25 <211> 94
<212> PRT
<213> Sequência artificial
<220>

<223> Descrição de Sequência artificial: polipeptídeo sintético

30 <400> 57

Val Ser Asp Val Pro Arg Asp Leu Glu Val Val Ala Ala Thr Pro Thr
1 5 10 15

Sér Leu Leu Ile Ser Trp Glu Tyr Asp Arg Val Lys Lys Arg Tyr Tyr
 20 25 30
 Arg Ile Thr Tyr Gly Glu Thr Gly Gly Asn Ser Pro Val Gln Glu Phe
 35 40 45
 5 Thr Val Pro Ala Tyr Tyr Pro Thr Ala Thr Ile Ser Gly Leu Lys Pro
 50 55 60
 Gly Val Asp Tyr Thr Ile Thr Val Tyr Ala Val Thr Glu His Ser His
 65 70 75 80
 Val Arg Arg Met His Val Pro Ile Ser Ile Asn Tyr Arg Thr
 10 85 90
 <210> 58
 <211> 90
 <212> PRT
 <213> Sequência artificial
 15 <220>
 <223> Descrição de Sequência artificial: polipeptídeo sintético
 <400> 58
 Val Ser Asp Val Pro Arg Asp Leu Glu Val Val Ala Ala Thr Pro Thr
 1 5 10 15
 20 Ser Leu Leu Ile Ser Trp Ala Ser Gln Val Leu Gly His Arg Tyr Tyr
 20 25 30
 Arg Ile Thr Tyr Gly Glu Thr Gly Gly Asn Ser Pro Val Gln Glu Phe
 35 40 45
 Thr Val Pro Ala Leu Pro Asn Thr Ala Thr Ile Ser Gly Leu Lys Pro
 25 50 55 60
 Gly Val Asp Tyr Thr Ile Thr Val Tyr Ala Val Thr Lys Met Arg Asp
 65 70 75 80
 Tyr Arg Pro Ile Ser Ile Asn Tyr Arg Thr
 85 90
 30 <210> 59
 <211> 94
 <212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Descrição de Sequência artificial: polipeptídeo sintético

<400> 59

5 Val Ser Asp Val Pro Arg Asp Leu Glu Val Val Ala Ala Thr Pro Thr
 1 5 10 15
 Ser Leu Leu Ile Ser Trp Gly Leu Asp Asp Tyr Tyr Gly Arg Tyr Tyr
 20 25 30
 Arg Ile Thr Tyr Gly Glu Thr Gly Gly Asn Ser Pro Val Gln Glu Phe
 10 35 40 45
 Thr Val Pro Gly Ser Tyr Pro Thr Ala Thr Ile Ser Gly Leu Lys Pro
 50 55 60
 Gly Val Asp Tyr Thr Ile Thr Val Tyr Ala Val Thr Asp Arg Lys His
 65 70 75 80
 15 Tyr Met Tyr Tyr His His Pro Ile Ser Ile Asn Tyr Arg Thr
 85 90

<210> 60

<211> 94

<212> PRT

20 <213> Sequência artificial

<220>

<223> Descrição de Sequência artificial: polipeptídeo sintético

<400> 60

25 Val Ser Asp Val Pro Arg Asp Leu Glu Val Val Ala Ala Thr Pro Thr
 1 5 10 15
 Ser Leu Leu Ile Ser Trp Lys Tyr Tyr Gly Ser Arg Asp Arg Tyr Tyr
 20 25 30
 Arg Ile Thr Tyr Gly Glu Thr Gly Gly Asn Ser Pro Val Gln Glu Phe
 35 40 45
 30 Thr Val Pro Glu Ser Tyr Pro Thr Ala Thr Ile Ser Gly Leu Lys Pro
 50 55 60
 Gly Val Asp Tyr Thr Ile Thr Val Tyr Ala Val Thr Asp Ser Arg Leu

65 70 75 80
 Tyr Arg Tyr Tyr His Ala Pro Ile Ser Ile Asn Tyr Arg Thr
 85 90
 <210> 61
 5 <211> 92
 <212> PRT
 <213> Sequência artificial
 <220>
 <223> Descrição de Sequência artificial: polipeptídeo sintético
 10 <400> 61
 Val Ser Asp Val Pro Arg Asp Leu Glu Val Val Ala Ala Thr Pro Thr
 1 5 10 15
 Ser Leu Leu Ile Ser Trp Ser Arg Ala Val Arg Val Arg Arg Tyr Tyr
 20 25 30
 15 Arg Ile Thr Tyr Gly Glu Thr Gly Gly Asn Ser Pro Val Gln Glu Phe
 35 40 45
 Thr Val Pro Ala Asn Met Phe Thr Ala Thr Ile Ser Gly Leu Lys Pro
 50 55 60
 Gly Val Asp Tyr Thr Ile Thr Val Tyr Ala Val Thr Ile Pro His Tyr
 20 65 70 75 80
 Arg Asn Tyr Lys Pro Ile Ser Ile Asn Tyr Arg Thr
 85 90
 <210> 62
 <211> 94
 25 <212> PRT
 <213> Sequência artificial
 <220>
 <223> Descrição de Sequência artificial: polipeptídeo sintético
 <400> 62
 30 Val Ser Asp Val Pro Arg Asp Leu Glu Val Val Ala Ala Thr Pro Thr
 1 5 10 15
 Ser Leu Leu Ile Ser Trp Ser Tyr Val Tyr Ala Pro Tyr Arg Tyr Tyr

20 25 30
 Arg Ile Thr Tyr Gly Glu Thr Gly Gly Asn Ser Pro Val Gln Glu Phe
 35 40 45
 Thr Val Pro Ala His Tyr Pro Thr Ala Thr Ile Ser Gly Leu Lys Pro
 5 50 55 60
 Gly Val Asp Tyr Thr Ile Thr Val Tyr Ala Val Thr Glu Lys Thr Ser
 65 70 75 80
 Tyr Arg Ile Met His Ser Pro Ile Ser Ile Asn Tyr Arg Thr
 85 90
 10 <210> 63
 <211> 94
 <212> PRT
 <213> Sequência artificial
 <220>
 15 <223> Descrição de Sequência artificial: polipeptídeo sintético
 <400> 63
 Val Ser Asp Val Pro Arg Asp Leu Glu Val Val Ala Ala Thr Pro Thr
 1 5 10 15
 Ser Leu Leu Ile Ser Trp Tyr Tyr Met Pro His Arg Asn Arg Tyr Tyr
 20 20 25 30
 Arg Ile Thr Tyr Gly Glu Thr Gly Gly Asn Ser Pro Val Gln Glu Phe
 35 40 45
 Thr Val Pro Ala Ser Tyr Pro Thr Ala Thr Ile Ser Gly Leu Lys Pro
 50 55 60
 25 Gly Val Asp Tyr Thr Ile Thr Val Tyr Ala Val Thr Asp Gln Asn Tyr
 65 70 75 80
 Tyr Arg Tyr Tyr His Lys Pro Ile Ser Ile Asn Tyr Arg Thr
 85 90
 <210> 64
 30 <211> 94
 <212> PRT
 <213> Sequência artificial

<220>

<223> Descrição de Sequência artificial: polipeptídeo sintético

<400> 64

Val Ser Asp Val Pro Arg Asp Leu Glu Val Val Ala Ala Thr Pro Thr
 5 1 5 10 15
 Ser Leu Leu Ile Ser Trp Thr Tyr Asp Ala His Lys Arg Arg Tyr Tyr
 20 25 30
 Arg Ile Thr Tyr Gly Glu Thr Gly Gly Asn Ser Pro Val Gln Glu Phe
 35 40 45
 10 Thr Val Pro Ser Ser Tyr Pro Thr Ala Thr Ile Ser Gly Leu Lys Pro
 50 55 60
 Gly Val Asp Tyr Thr Ile Thr Val Tyr Ala Val Thr Glu Lys Gly Ser
 65 70 75 80
 Leu Lys Ile Leu His Tyr Pro Ile Ser Ile Asn Tyr Arg Thr
 15 85 90

<210> 65

<211> 92

<212> PRT

<213> Sequência artificial

20 <220>

<223> Descrição de Sequência artificial: polipeptídeo sintético

<400> 65

Val Ser Asp Val Pro Arg Asp Leu Glu Val Val Ala Ala Thr Pro Thr
 1 5 10 15
 25 Ser Leu Leu Ile Ser Trp Ala Pro Tyr Val Arg Val Ala Arg Tyr Tyr
 20 25 30
 Arg Ile Thr Tyr Gly Glu Thr Gly Gly Asn Ser Pro Val Gln Glu Phe
 35 40 45
 Thr Val Pro Thr Leu Ser Arg Thr Ala Thr Ile Ser Gly Leu Lys Pro
 50 55 60
 30 Gly Val Asp Tyr Thr Ile Thr Val Tyr Ala Val Thr Ser Pro Ser Leu
 65 70 75 80

Arg Asp Tyr Arg Pro Ile Ser Ile Asn Tyr Arg Thr

85

90

<210> 66

<211> 94

5 <212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Descrição de Sequência artificial: polipeptídeo sintético

<400> 66

10 Val Ser Asp Val Pro Arg Asp Leu Glu Val Val Ala Ala Thr Pro Thr

1 5 10 15

Ser Leu Leu Ile Ser Trp Tyr Pro Glu Tyr Val Arg Asn Arg Tyr Tyr

20 25 30

Arg Ile Thr Tyr Gly Glu Thr Gly Gly Asn Ser Pro Val Gln Glu Phe

15 35 40 45

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

50 55 60

Gly Val Asp Tyr Thr Ile Thr Val Tyr Ala Val Thr Thr Lys Gly Val

65 70 75 80

20 His Tyr Leu Tyr His Ser Pro Ile Ser Ile Asn Tyr Arg Thr

85 90

<210> 67

<211> 94

<212> PRT

25 <213> Sequência artificial

<220>

<223> Descrição de Sequência artificial: polipeptídeo sintético

<400> 67

Val Ser Asp Val Pro Arg Asp Leu Glu Val Val Ala Ala Thr Pro Thr

30 1 5 10 15

Ser Leu Leu Ile Ser Trp Pro Asp Ile Pro Ile Val Ala Arg Tyr Tyr

20 25 30

Arg Ile Thr Tyr Gly Glu Thr Gly Gly Asn Ser Pro Val Gln Glu Phe
 35 40 45
 Thr Val Pro Val Val Gly Thr Thr Ala Thr Ile Ser Gly Leu Lys Pro
 50 55 60
 5 Gly Val Asp Tyr Thr Ile Thr Val Tyr Ala Val Thr Ser Ser Met Leu
 65 70 75 80
 Tyr Ile Gln Ile Glu Pro Pro Ile Ser Ile Asn Tyr Arg Thr
 85 90
 <210> 68
 10 <211> 94
 <212> PRT
 <213> Sequência artificial
 <220>
 <223> Descrição de Sequência artificial: polipeptídeo sintético
 15 <400> 68
 Val Ser Asp Val Pro Arg Asp Leu Glu Val Val Ala Ala Thr Pro Thr
 1 5 10 15
 Ser Leu Leu Ile Ser Trp Ala His Ser Gly Tyr Ser Tyr Arg Tyr Tyr
 20 25 30
 20 Arg Ile Thr Tyr Gly Glu Thr Gly Gly Asn Ser Pro Val Gln Glu Phe
 35 40 45
 Thr Val Pro Glu Ser Tyr Pro Thr Ala Thr Ile Ser Gly Leu Lys Pro
 50 55 60
 Gly Val Asp Tyr Thr Ile Thr Val Tyr Ala Val Thr Asp Lys Asn Thr
 25 65 70 75 80
 Tyr Arg Tyr Tyr His Lys Pro Ile Ser Ile Asn Tyr Arg Thr
 85 90
 <210> 69
 <211> 94
 30 <212> PRT
 <213> Sequência artificial
 <220>

<223> Descrição de Sequência artificial: polipeptídeo sintético
<400> 69

Val Ser Asp Val Pro Arg Asp Leu Glu Val Val Ala Ala Thr Pro Thr
1 5 10 15
5 Ser Leu Leu Ile Ser Trp Asp His Ser Gly Ser Ser Tyr Arg Tyr Tyr
20 25 30
Arg Ile Thr Tyr Gly Glu Thr Gly Gly Asn Ser Pro Val Gln Glu Phe
35 40 45
Thr Val Pro Glu Ser Tyr Pro Thr Ala Thr Ile Ser Gly Leu Lys Pro
10 50 55 60
Gly Val Asp Tyr Thr Ile Thr Val Tyr Ala Val Thr Asp Lys Asn Thr
65 70 75 80
Tyr Arg Tyr Tyr His Lys Pro Ile Ser Ile Asn Tyr Arg Thr
85 90

15 <210> 70
<211> 94
<212> PRT
<213> Sequência artificial
<220>

20 <223> Descrição de Sequência artificial: polipeptídeo sintético
<400> 70

Val Ser Asp Val Pro Arg Asp Leu Glu Val Val Ala Ala Thr Pro Thr
1 5 10 15
Ser Leu Leu Ile Ser Trp His Val Thr Ser Asp Arg Asn Arg Tyr Tyr
25 20 25 30
Arg Ile Thr Tyr Gly Glu Thr Gly Gly Asn Ser Pro Val Gln Glu Phe
35 40 45
Thr Val Pro Ala Thr Tyr Pro Thr Ala Thr Ile Ser Gly Leu Lys Pro
50 55 60
30 Gly Val Asp Tyr Thr Ile Thr Val Tyr Ala Val Thr Ile Tyr Lys Gly
65 70 75 80
His Gln Ile Gln Tyr Thr Pro Ile Ser Ile Asn Tyr Arg Thr

85 90

<210> 71

<211> 94

<212> PRT

5 <213> Sequência artificial

<220>

<223> Descrição de Sequência artificial: polipeptídeo sintético

<400> 71

Val Ser Asp Val Pro Arg Asp Leu Glu Val Val Ala Ala Thr Pro Thr

10 1 5 10 15

Ser Leu Leu Ile Ser Trp Ile Pro Tyr Ser Gly Pro Ser Arg Tyr Tyr

20 25 30

Arg Ile Thr Tyr Gly Glu Thr Gly Gly Asn Ser Pro Val Gln Glu Phe

35 40 45

15 Thr Val Pro Ala His Tyr Pro Thr Ala Thr Ile Ser Gly Leu Lys Pro

50 55 60

Gly Val Asp Tyr Thr Ile Thr Val Tyr Ala Val Thr Gln Ser Val Ile

65 70 75 80

Val Tyr Lys Gln Ala Ala Pro Ile Ser Ile Asn Tyr Arg Thr

20 85 90

<210> 72

<211> 94

<212> PRT

<213> Sequência artificial

25 <220>

<223> Descrição de Sequência artificial: polipeptídeo sintético

<400> 72

Val Ser Asp Val Pro Arg Asp Leu Glu Val Val Ala Ala Thr Pro Thr

1 5 10 15

30 Ser Leu Leu Ile Ser Trp Ser Tyr Asp Gln Ser Arg Tyr Arg Tyr Tyr

20 25 30

Arg Ile Thr Tyr Gly Glu Thr Gly Gly Asn Ser Pro Val Gln Glu Phe

35 40 45
 Thr Val Pro Ala Met Tyr Pro Thr Ala Thr Ile Ser Gly Leu Lys Pro
 50 55 60
 Gly Val Asp Tyr Thr Ile Thr Val Tyr Ala Val Thr Asp Lys Asn Thr
 5 65 70 75 80
 Tyr Arg Tyr Tyr His Lys Pro Ile Ser Ile Asn Tyr Arg Thr
 85 90
 <210> 73
 <211> 92
 10 <212> PRT
 <213> Sequência artificial
 <220>
 <223> Descrição de Sequência artificial: polipeptídeo sintético
 <400> 73
 15 Val Ser Asp Val Pro Arg Asp Leu Glu Val Val Ala Ala Thr Pro Thr
 1 5 10 15
 Ser Leu Leu Ile Ser Trp Gly Glu Pro Leu Glu Asp Ala Arg Tyr Tyr
 20 25 30
 Arg Ile Thr Tyr Gly Glu Thr Gly Gly Asn Ser Pro Val Gln Glu Phe
 20 35 40 45
 Thr Val Pro Asp His Ser Gln Thr Ala Thr Ile Ser Gly Leu Lys Pro
 50 55 60
 Gly Val Asp Tyr Thr Ile Thr Val Tyr Ala Val Thr Ala Gly Ser Trp
 65 70 75 80
 25 Leu Arg Ile Trp Pro Ile Ser Ile Asn Tyr Arg Thr
 85 90
 <210> 74
 <211> 94
 <212> PRT
 30 <213> Sequência artificial
 <220>
 <223> Descrição de Sequência artificial: polipeptídeo sintético

<400> 74

Val Ser Asp Val Pro Arg Asp Leu Glu Val Val Ala Ala Thr Pro Thr

1 5 10 15

Ser Leu Leu Ile Ser Trp Pro Lys Arg Pro Met Asn Met Arg Tyr Tyr

5 20 25 30

Arg Ile Thr Tyr Gly Glu Thr Gly Gly Asn Ser Pro Val Gln Glu Phe

35 40 45

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

50 55 60

10 Gly Val Asp Tyr Thr Ile Thr Val Tyr Ala Val Thr Tyr Leu Tyr Ala

65 70 75 80

Thr Tyr Val Met His Gln Pro Ile Ser Ile Asn Tyr Arg Thr

85 90

<210> 75

15 <211> 94

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Descrição de Sequência artificial: polipeptídeo sintético

20 <400> 75

Val Ser Asp Val Pro Arg Asp Leu Glu Val Val Ala Ala Thr Pro Thr

1 5 10 15

Ser Leu Leu Ile Ser Trp Ser Tyr Asp Gln Ser Arg Tyr Arg Tyr Tyr

20 25 30

25 Arg Ile Thr Tyr Gly Glu Thr Gly Gly Asn Ser Pro Val Gln Glu Phe

35 40 45

Thr Val Pro Ala Met Tyr Pro Thr Ala Thr Ile Ser Gly Leu Lys Pro

50 55 60

Gly Val Asp Tyr Thr Ile Thr Val Tyr Ala Val Thr Glu Arg Asp Arg

30 65 70 75 80

Tyr Ser Tyr Met His His Pro Ile Ser Ile Asn Tyr Arg Thr

85 90

<210> 76
 <211> 90
 <212> PRT
 <213> Sequência artificial
 5 <220>
 <223> Descrição de Sequência artificial: polipeptídeo sintético
 <400> 76
 Val Ser Asp Val Pro Arg Asp Leu Glu Val Val Ala Ala Thr Pro Thr
 1 5 10 15
 10 Ser Leu Leu Ile Ser Trp Pro Phe Gln Ala Val Ser Asn Arg Tyr Tyr
 20 25 30
 Arg Ile Thr Tyr Gly Glu Thr Gly Gly Asn Ser Pro Val Gln Glu Phe
 35 40 45
 Thr Val Pro Ala Phe Pro Asn Thr Ala Thr Ile Ser Gly Leu Lys Pro
 15 50 55 60
 Gly Val Asp Tyr Thr Ile Thr Val Tyr Ala Val Thr Lys Met Arg Asp
 65 70 75 80
 Tyr Arg Pro Ile Ser Ile Asn Tyr Arg Thr
 85 90
 20 <210> 77
 <211> 94
 <212> PRT
 <213> Sequência artificial
 <220>
 25 <223> Descrição de Sequência artificial: polipeptídeo sintético
 <400> 77
 Val Ser Asp Val Pro Arg Asp Leu Glu Val Val Ala Ala Thr Pro Thr
 1 5 10 15
 Ser Leu Leu Ile Ser Trp Tyr His Asp Met His Arg Ser Arg Tyr Tyr
 30 20 25 30
 Arg Ile Thr Tyr Gly Glu Thr Gly Gly Asn Ser Pro Val Gln Glu Phe
 35 40 45

Thr Val Pro Ser Tyr Tyr Pro Thr Ala Thr Ile Ser Gly Leu Lys Pro
 50 55 60
 Gly Val Asp Tyr Thr Ile Thr Val Tyr Ala Val Thr Lys Gly Ser Gly
 65 70 75 80
 5 Tyr Gln Val Met His Thr Pro Ile Ser Ile Asn Tyr Arg Thr
 85 90
 <210> 78
 <211> 94
 <212> PRT
 10 <213> Sequência artificial
 <220>
 <223> Descrição de Sequência artificial: polipeptídeo sintético
 <400> 78
 Val Ser Asp Val Pro Arg Asp Leu Glu Val Val Ala Ala Thr Pro Thr
 15 1 5 10 15
 Ser Leu Leu Ile Ser Trp Ala Tyr Tyr Met Gly Gly Tyr Arg Tyr Tyr
 20 25 30
 Arg Ile Thr Tyr Gly Glu Thr Gly Gly Asn Ser Pro Val Gln Glu Phe
 35 40 45
 20 Thr Val Pro Gly Ser Tyr Pro Thr Ala Thr Ile Ser Gly Leu Lys Pro
 50 55 60
 Gly Val Asp Tyr Thr Ile Thr Val Tyr Ala Val Thr Asp Arg Lys His
 65 70 75 80
 Tyr Met Tyr Tyr His His Pro Ile Ser Ile Asn Tyr Arg Thr
 25 85 90
 <210> 79
 <211> 94
 <212> PRT
 <213> Sequência artificial
 30 <220>
 <223> Descrição de Sequência artificial: polipeptídeo sintético
 <400> 79

Val Ser Asp Val Pro Arg Asp Leu Glu Val Val Ala Ala Thr Pro Thr
 1 5 10 15
 Ser Leu Leu Ile Ser Trp Tyr Tyr Met Pro His Arg Asn Arg Tyr Tyr
 20 25 30
 5 Arg Ile Thr Tyr Gly Glu Thr Gly Gly Asn Ser Pro Val Gln Glu Phe
 35 40 45
 Thr Val Pro Ser Thr Tyr Pro Thr Ala Thr Ile Ser Gly Leu Lys Pro
 50 55 60
 Gly Val Asp Tyr Thr Ile Thr Val Tyr Ala Val Thr Asn His His Val
 10 65 70 75 80
 His Arg Leu Met His Ile Pro Ile Ser Ile Asn Tyr Arg Thr
 85 90
 <210> 80
 <211> 94
 15 <212> PRT
 <213> Sequência artificial
 <220>
 <223> Descrição de Sequência artificial: polipeptídeo sintético
 <400> 80
 20 Val Ser Asp Val Pro Arg Asp Leu Glu Val Val Ala Ala Thr Pro Thr
 1 5 10 15
 Ser Leu Leu Ile Ser Trp His Glu Asp Pro Ser Thr Tyr Arg Tyr Tyr
 20 25 30
 Arg Ile Thr Tyr Gly Glu Thr Gly Gly Asn Ser Pro Val Gln Glu Phe
 35 40 45
 25 Thr Val Pro Ser Tyr Tyr Pro Thr Ala Thr Ile Ser Gly Leu Lys Pro
 50 55 60
 Gly Val Asp Tyr Thr Ile Thr Val Tyr Ala Val Thr Asp Tyr His Glu
 65 70 75 80
 30 Leu Val Tyr Met His His Pro Ile Ser Ile Asn Tyr Arg Thr
 85 90
 <210> 81

<211> 92

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

5 <223> Descrição de Sequência artificial: polipeptídeo sintético

<400> 81

Val Ser Asp Val Pro Arg Asp Leu Glu Val Val Ala Ala Thr Pro Thr

1 5 10 15

Ser Leu Leu Ile Ser Trp Asp Glu Ile Glu Phe Pro Val Arg Tyr Tyr

10 20 25 30

Arg Ile Thr Tyr Gly Glu Thr Gly Gly Asn Ser Pro Val Gln Glu Phe

35 40 45

Thr Val Pro Gly Pro Arg Gly Thr Ala Thr Ile Ser Gly Leu Lys Pro

50 55 60

15 Gly Val Asp Tyr Thr Ile Thr Val Tyr Ala Val Thr Met His Tyr Tyr

65 70 75 80

Leu Arg Val Trp Pro Ile Ser Ile Asn Tyr Arg Thr

85 90

<210> 82

20 <211> 92

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Descrição de Sequência artificial: polipeptídeo sintético

25 <400> 82

Val Ser Asp Val Pro Arg Asp Leu Glu Val Val Ala Ala Thr Pro Thr

1 5 10 15

Ser Leu Leu Ile Ser Trp Ser Thr His Phe Thr Val Ser Arg Tyr Tyr

20 25 30

30 Arg Ile Thr Tyr Gly Glu Thr Gly Gly Asn Ser Pro Val Gln Glu Phe

35 40 45

Thr Val Pro Lys Val Asn Tyr Thr Ala Thr Ile Ser Gly Leu Lys Pro

50 55 60
 Gly Val Asp Tyr Thr Ile Thr Val Tyr Ala Val Thr His Ser Arg Pro
 65 70 75 80
 Arg His Tyr His Pro Ile Ser Ile Asn Tyr Arg Thr
 5 85 90
 <210> 83
 <211> 94
 <212> PRT
 <213> Sequência artificial
 10 <220>
 <223> Descrição de Sequência artificial: polipeptídeo sintético
 <400> 83
 Val Ser Asp Val Pro Arg Asp Leu Glu Val Val Ala Ala Thr Pro Thr
 1 5 10 15
 15 Ser Leu Leu Ile Ser Trp Gly Lys His Ile Arg Val Ser Arg Tyr Tyr
 20 25 30
 Arg Ile Thr Tyr Gly Glu Thr Gly Gly Asn Ser Pro Val Gln Glu Phe
 35 40 45
 Thr Val Pro His Asn Ser Val Thr Ala Thr Ile Ser Gly Leu Lys Pro
 20 50 55 60
 Gly Val Asp Tyr Thr Ile Thr Val Tyr Ala Val Thr Val Ala Tyr Asn
 65 70 75 80
 Tyr Leu Arg Asp Tyr Lys Pro Ile Ser Ile Asn Tyr Arg Thr
 85 90
 25 <210> 84
 <211> 92
 <212> PRT
 <213> Sequência artificial
 <220>
 30 <223> Descrição de Sequência artificial: polipeptídeo sintético
 <400> 84
 Val Ser Asp Val Pro Arg Asp Leu Glu Val Val Ala Ala Thr Pro Thr

1 5 10 15
 Ser Leu Leu Ile Ser Trp His Ser Asn Leu Leu Val Gln Arg Tyr Tyr
 20 25 30
 Arg Ile Thr Tyr Gly Glu Thr Gly Gly Asn Ser Pro Val Gln Glu Phe
 5 35 40 45
 Thr Val Pro Ser Ser Ala Val Thr Ala Thr Ile Ser Gly Leu Lys Pro
 50 55 60
 Gly Val Asp Tyr Thr Ile Thr Val Tyr Ala Val Thr Pro Gly His Leu
 65 70 75 80
 10 Arg Lys Tyr Gly Pro Ile Ser Ile Asn Tyr Arg Thr
 85 90
 <210> 85
 <211> 94
 <212> PRT
 15 <213> Sequência artificial
 <220>
 <223> Descrição de Sequência artificial: polipeptídeo sintético
 <400> 85
 Val Ser Asp Val Pro Arg Asp Leu Glu Val Val Ala Ala Thr Pro Thr
 20 1 5 10 15
 Ser Leu Leu Ile Ser Trp Asp Tyr Asp Arg Ser Lys Tyr Arg Tyr Tyr
 20 25 30
 Arg Ile Thr Tyr Gly Glu Thr Gly Gly Asn Ser Pro Val Gln Glu Phe
 35 40 45
 25 Thr Val Pro Ala Ser Tyr Pro Thr Ala Thr Ile Ser Gly Leu Lys Pro
 50 55 60
 Gly Val Asp Tyr Thr Ile Thr Val Tyr Ala Val Thr Gln Lys Asp Ile
 65 70 75 80
 Tyr Tyr Tyr Ile Tyr Tyr Pro Ile Ser Ile Asn Tyr Arg Thr
 30 85 90
 <210> 86
 <211> 94

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Descrição de Sequência artificial: polipeptídeo sintético

5 <400> 86

Val Ser Asp Val Pro Arg Asp Leu Glu Val Val Ala Ala Thr Pro Thr

1 5 10 15

Ser Leu Leu Ile Ser Trp Gly Asp Glu Leu Val Ala Ala Arg Tyr Tyr

20 25 30

10 Arg Ile Thr Tyr Gly Glu Thr Gly Gly Asn Ser Pro Val Gln Glu Phe

35 40 45

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

50 55 60

Gly Val Asp Tyr Thr Ile Thr Val Tyr Ala Val Thr His Leu Leu Gly

15 65 70 75 80

Thr Leu Trp Leu Ile Pro Pro Ile Ser Ile Asn Tyr Arg Thr

85 90

<210> 87

<211> 92

20 <212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Descrição da Sequência Artificial

polipeptídeo sintético

25 <400> 87

Val Ser Asp Val Pro Arg Asp Leu Glu Val Val Ala Ala Thr Pro Thr

1 5 10 15

Ser Leu Leu Ile Ser Trp Ser Leu Tyr Leu Arg Val Lys Arg Tyr Tyr

20 25 30

30 Arg Ile Thr Tyr Gly Glu Thr Gly Gly Asn Ser Pro Val Gln Glu Phe

35 40 45

Thr Val Pro Ser Asn Ala Met Thr Ala Thr Ile Ser Gly Leu Lys Pro

50 55 60
 Gly Val Asp Tyr Thr Ile Thr Val Tyr Ala Val Thr Ser Pro Ser Leu
 65 70 75 80
 Arg Gly Tyr Gly Pro Ile Ser Ile Asn Tyr Arg Thr
 5 85 90
 <210> 88
 <211> 94
 <212> PRT
 <213> Sequência artificial
 10 <220>
 <223> Descrição de Sequência artificial: polipeptídeo sintético
 <400> 88
 Val Ser Asp Val Pro Arg Asp Leu Glu Val Val Ala Ala Thr Pro Thr
 1 5 10 15
 15 Ser Leu Leu Ile Ser Trp Ala Tyr Asp Met His Arg Lys Arg Tyr Tyr
 20 25 30
 Arg Ile Thr Tyr Gly Glu Thr Gly Gly Asn Ser Pro Val Gln Glu Phe
 35 40 45
 Thr Val Pro Ser Ser Tyr Pro Thr Ala Thr Ile Ser Gly Leu Lys Pro
 20 50 55 60
 Gly Val Asp Tyr Thr Ile Thr Val Tyr Ala Val Thr Ser Lys Tyr Ser
 65 70 75 80
 Gly His Tyr Val His Asn Pro Ile Ser Ile Asn Tyr Arg Thr
 85 90
 25 <210> 89
 <211> 94
 <212> PRT
 <213> Sequência artificial
 <220>
 30 <223> Descrição de Sequência artificial: polipeptídeo sintético
 <400> 89
 Val Ser Asp Val Pro Arg Asp Leu Glu Val Val Ala Ala Thr Pro Thr

1 5 10 15
 Ser Leu Leu Ile Ser Trp Leu Asp Leu Ser Leu Lys Met Arg Tyr Tyr
 20 25 30
 Arg Ile Thr Tyr Gly Glu Thr Gly Gly Asn Ser Pro Val Gln Glu Phe
 5 35 40 45
 Thr Val Pro Ser His His Gln Thr Ala Thr Ile Ser Gly Leu Lys Pro
 50 55 60
 Gly Val Asp Tyr Thr Ile Thr Val Tyr Ala Val Thr Glu Tyr Ala Ala
 65 70 75 80
 10 Tyr Arg Met Met His Ile Pro Ile Ser Ile Asn Tyr Arg Thr
 85 90
 <210> 90
 <211> 94
 <212> PRT
 15 <213> Sequência artificial
 <220>
 <223> Descrição de Sequência artificial: polipeptídeo sintético
 <400> 90
 Val Ser Asp Val Pro Arg Asp Leu Glu Val Val Ala Ala Thr Pro Thr
 20 1 5 10 15
 Ser Leu Leu Ile Ser Trp Gly Leu Ile Leu Gly Arg Asp Arg Tyr Tyr
 20 25 30
 Arg Ile Thr Tyr Gly Glu Thr Gly Gly Asn Ser Pro Val Gln Glu Phe
 35 40 45
 25 Thr Val Pro Ala Phe Pro Phe Thr Ala Thr Ile Ser Gly Leu Lys Pro
 50 55 60
 Gly Val Asp Tyr Thr Ile Thr Val Tyr Ala Val Thr Tyr Arg Gly Phe
 65 70 75 80
 Asp Thr Phe Phe Pro Asn Pro Ile Ser Ile Asn Tyr Arg Thr
 30 85 90
 <210> 91
 <211> 90

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Descrição de Sequência artificial: polipeptídeo sintético

5 <400> 91

Val Ser Asp Val Pro Arg Asp Leu Glu Val Val Ala Ala Thr Pro Thr

1 5 10 15

Ser Leu Leu Ile Ser Trp Leu Pro Ser Pro Ala Ile Thr Arg Tyr Tyr

20 25 30

10 Arg Ile Thr Tyr Gly Glu Thr Gly Gly Asn Ser Pro Val Gln Glu Phe

35 40 45

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

50 55 60

Gly Val Asp Tyr Thr Ile Thr Val Tyr Ala Val Thr Tyr Arg Tyr Ser

15 65 70 75 80

Thr Trp Pro Ile Ser Ile Asn Tyr Arg Thr

85 90

<210> 92

<211> 94

20 <212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Descrição de Sequência artificial: polipeptídeo sintético

<400> 92

25 Val Ser Asp Val Pro Arg Asp Leu Glu Val Val Ala Ala Thr Pro Thr

1 5 10 15

Ser Leu Leu Ile Ser Trp Val Tyr Glu Asn Asn Arg Gln Arg Tyr Tyr

20 25 30

Arg Ile Thr Tyr Gly Glu Thr Gly Gly Asn Ser Pro Val Gln Glu Phe

30 35 40 45

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

50 55 60

Gly Val Asp Tyr Thr Ile Thr Val Tyr Ala Val Thr Gln Gln Ser Gln
 65 70 75 80
 His Ala Tyr Tyr His Leu Pro Ile Ser Ile Asn Tyr Arg Thr
 85 90
 5 <210> 93
 <211> 94
 <212> PRT
 <213> Sequência artificial
 <220>
 10 <223> Descrição de Sequência artificial: polipeptídeo sintético
 <400> 93
 Val Ser Asp Val Pro Arg Asp Leu Glu Val Val Ala Ala Thr Pro Thr
 1 5 10 15
 Ser Leu Leu Ile Ser Trp Val Glu Phe His Lys Pro Asp Arg Tyr Tyr
 15 20 25 30
 Arg Ile Thr Tyr Gly Glu Thr Gly Gly Asn Ser Pro Val Gln Glu Phe
 35 40 45
 Thr Val Pro Ala Glu Gln Gly Thr Ala Thr Ile Ser Gly Leu Lys Pro
 50 55 60
 20 Gly Val Asp Tyr Thr Ile Thr Val Tyr Ala Val Thr Glu Tyr Ala Ala
 65 70 75 80
 Tyr Arg Met Met His Ile Pro Ile Ser Ile Asn Tyr Arg Thr
 85 90
 <210> 94
 25 <211> 92
 <212> PRT
 <213> Sequência artificial
 <220>
 <223> Descrição de Sequência artificial: polipeptídeo sintético
 30 <400> 94
 Val Ser Asp Val Pro Arg Asp Leu Glu Val Val Ala Ala Thr Pro Thr
 1 5 10 15

Ser Leu Leu Ile Ser Trp Asp Glu Ile Glu Phe Pro Val Arg Tyr Tyr
 20 25 30
 Arg Ile Thr Tyr Gly Glu Thr Gly Gly Asn Ser Pro Val Gln Glu Phe
 35 40 45
 5 Thr Val Pro Gly Pro Arg Gly Thr Ala Thr Ile Ser Gly Leu Lys Pro
 50 55 60
 Gly Val Asp Tyr Thr Ile Thr Val Tyr Ala Val Thr Met His Tyr Tyr
 65 70 75 80
 Leu Arg Val Trp Pro Ile Ser Ile Asn Tyr Arg Thr
 10 85 90
 <210> 95
 <211> 94
 <212> PRT
 <213> Sequência artificial
 15 <220>
 <223> Descrição de Sequência artificial: polipeptídeo sintético
 <400> 95
 Val Ser Asp Val Pro Arg Asp Leu Glu Val Val Ala Ala Thr Pro Thr
 1 5 10 15
 20 Ser Leu Leu Ile Ser Trp Ser Tyr Asn Met Lys Pro Gln Arg Tyr Tyr
 20 25 30
 Arg Ile Thr Tyr Gly Glu Thr Gly Gly Asn Ser Pro Val Gln Glu Phe
 35 40 45
 Thr Val Pro Ser Ser Tyr Pro Thr Ala Thr Ile Ser Gly Leu Lys Pro
 25 50 55 60
 Gly Val Asp Tyr Thr Ile Thr Val Tyr Ala Val Thr Asp Arg Tyr Met
 65 70 75 80
 Tyr Arg Met Leu His Lys Pro Ile Ser Ile Asn Tyr Arg Thr
 85 90
 30 <210> 96
 <211> 94
 <212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Descrição de Sequência artificial: polipeptídeo sintético

<400> 96

5 Val Ser Asp Val Pro Arg Asp Leu Glu Val Val Ala Ala Thr Pro Thr
 1 5 10 15
 Ser Leu Leu Ile Ser Trp Tyr Tyr Glu His Ile Arg Gly Arg Tyr Tyr
 20 25 30
 Arg Ile Thr Tyr Gly Glu Thr Gly Gly Asn Ser Pro Val Gln Glu Phe
 10 35 40 45
 Thr Val Pro Ser Ser Tyr Pro Thr Ala Thr Ile Ser Gly Leu Lys Pro
 50 55 60
 Gly Val Asp Tyr Thr Ile Thr Val Tyr Ala Val Thr Gly Tyr Gly Gln
 65 70 75 80
 15 Tyr Tyr Tyr Tyr His Ser Pro Ile Ser Ile Asn Tyr Arg Thr
 85 90

<210> 97

<211> 94

<212> PRT

20 <213> Sequência artificial

<220>

<223> Descrição de Sequência artificial: polipeptídeo sintético

<400> 97

Val Ser Asp Val Pro Arg Asp Leu Glu Val Val Ala Ala Thr Pro Thr
 25 1 5 10 15
 Ser Leu Leu Ile Ser Trp Tyr Asn Asp Pro Arg Arg Asn Arg Tyr Tyr
 20 25 30
 Arg Ile Thr Tyr Gly Glu Thr Gly Gly Asn Ser Pro Val Gln Glu Phe
 35 40 45
 30 Thr Val Pro Ala Tyr Tyr Pro Thr Ala Thr Ile Ser Gly Leu Lys Pro
 50 55 60
 Gly Val Asp Tyr Thr Ile Thr Val Tyr Ala Val Thr Tyr Arg Tyr Ser

65 70 75 80
 Tyr Gln Tyr Gln His Ala Pro Ile Ser Ile Asn Tyr Arg Thr
 85 90
 <210> 98
 5 <211> 94
 <212> PRT
 <213> Sequência artificial
 <220>
 <223> Descrição de Sequência artificial: polipeptídeo sintético
 10 Val Ser Asp Val Pro Arg Asp Leu Glu Val Val Ala Ala Thr Pro Thr
 1 5 10 15
 Ser Leu Leu Ile Ser Trp Tyr Tyr Asp Asp His Ala Gln Arg Tyr Tyr
 20 25 30
 Arg Ile Thr Tyr Gly Glu Thr Gly Gly Asn Ser Pro Val Gln Glu Phe
 15 35 40 45
 Thr Val Pro Ser Thr Tyr Pro Thr Ala Thr Ile Ser Gly Leu Lys Pro
 50 55 60
 Gly Val Asp Tyr Thr Ile Thr Val Tyr Ala Val Thr Val Arg Gly Val
 65 70 75 80
 20 Tyr Tyr Tyr Tyr Tyr Gln Pro Ile Ser Ile Asn Tyr Arg Thr
 85 90
 <210> 99
 <211> 94
 <212> PRT
 25 <213> Sequência artificial
 <220>
 <223> Descrição de Sequência artificial: polipeptídeo sintético
 <400> 99
 Val Ser Asp Val Pro Arg Asp Leu Glu Val Val Ala Ala Thr Pro Thr
 30 1 5 10 15
 Ser Leu Leu Ile Ser Trp Ile Pro Thr Ser Lys Asn Gly Arg Tyr Tyr
 20 25 30

Arg Ile Thr Tyr Gly Glu Thr Gly Gly Asn Ser Pro Val Gln Glu Phe
 35 40 45
 Thr Val Pro Ser Tyr Tyr Pro Thr Ala Thr Ile Ser Gly Leu Lys Pro
 50 55 60
 5 Gly Val Asp Tyr Thr Ile Thr Val Tyr Ala Val Thr Glu Val Gln His
 65 70 75 80
 Tyr Arg Tyr Leu His Ala Pro Ile Ser Ile Asn Tyr Arg Thr
 85 90
 <210> 100
 10 <211> 94
 <212> PRT
 <213> Sequência artificial
 <220>
 <223> Descrição de Sequência artificial: polipeptídeo sintético
 15 <400> 100
 Val Ser Asp Val Pro Arg Asp Leu Glu Val Val Ala Ala Thr Pro Thr
 1 5 10 15
 Ser Leu Leu Ile Ser Trp Pro Thr His Tyr Lys Val Ala Arg Tyr Tyr
 20 25 30
 20 Arg Ile Thr Tyr Gly Glu Thr Gly Gly Asn Ser Pro Val Gln Glu Phe
 35 40 45
 Thr Val Pro Ala Tyr Tyr Pro Thr Ala Thr Ile Ser Gly Leu Lys Pro
 50 55 60
 Gly Val Asp Tyr Thr Ile Thr Val Tyr Ala Val Thr Glu His Ser His
 25 65 70 75 80
 Val Arg Arg Met His Val Pro Ile Ser Ile Asn Tyr Arg Thr
 85 90
 <210> 101
 <211> 94
 30 <212> PRT
 <213> Sequência artificial
 <220>

<223> Descrição de Sequência artificial: polipeptídeo sintético

<400> 101

Val Ser Asp Val Pro Arg Asp Leu Glu Val Val Ala Ala Thr Pro Thr
1 5 10 15

5 Ser Leu Leu Ile Ser Trp Leu Met Lys Leu Tyr Leu Glu Arg Tyr Tyr
20 25 30

Arg Ile Thr Tyr Gly Glu Thr Gly Gly Asn Ser Pro Val Gln Glu Phe
35 40 45

Thr Val Pro Pro Ser Tyr Ile Thr Ala Thr Ile Ser Gly Leu Lys Pro
10 50 55 60

Gly Val Asp Tyr Thr Ile Thr Val Tyr Ala Val Thr Tyr His Glu Ser
65 70 75 80

Gln Glu Gly Ala Gly His Pro Ile Ser Ile Asn Tyr Arg Thr
85 90

15 <210> 102

<211> 94

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

20 <223> Descrição de Sequência artificial: polipeptídeo sintético

<400> 102

Val Ser Asp Val Pro Arg Asp Leu Glu Val Val Ala Ala Thr Pro Thr
1 5 10 15

Ser Leu Leu Ile Ser Trp Glu Tyr Val Glu Tyr Thr His Arg Tyr Tyr
25 20 25 30

Arg Ile Thr Tyr Gly Glu Thr Gly Gly Asn Ser Pro Val Gln Glu Phe
35 40 45

Thr Val Pro Ala Val His Tyr Thr Ala Thr Ile Ser Gly Leu Lys Pro
50 55 60

30 Gly Val Asp Tyr Thr Ile Thr Val Tyr Ala Val Thr Tyr Met Asp Thr
65 70 75 80

Ser Met Tyr Val Ser Ser Pro Ile Ser Ile Asn Tyr Arg Thr

85 90

<210> 103

<211> 94

<212> PRT

5 <213> Sequência artificial

<220>

<223> Descrição de Sequência artificial: polipeptídeo sintético

<400> 103

Val Ser Asp Val Pro Arg Asp Leu Glu Val Val Ala Ala Thr Pro Thr

10 1 5 10 15

Ser Leu Leu Ile Ser Trp Lys Tyr Asp Ser Tyr Ser Asn Arg Tyr Tyr

20 25 30

Arg Ile Thr Tyr Gly Glu Thr Gly Gly Asn Ser Pro Val Gln Glu Phe

35 40 45

15 Thr Val Pro Ser Ser Tyr Pro Thr Ala Thr Ile Ser Gly Leu Lys Pro

50 55 60

Gly Val Asp Tyr Thr Ile Thr Val Tyr Ala Val Thr Tyr Gln Ser Ile

65 70 75 80

Tyr Tyr Tyr Met His Ser Pro Ile Ser Ile Asn Tyr Arg Thr

20 85 90

<210> 104

<211> 94

<212> PRT

<213> Sequência artificial

25 <220>

<223> Descrição de Sequência artificial: polipeptídeo sintético

<400> 104

Val Ser Asp Val Pro Arg Asp Leu Glu Val Val Ala Ala Thr Pro Thr

1 5 10 15

30 Ser Leu Leu Ile Ser Trp Glu Tyr Asp Gly Pro Ala Gly Arg Tyr Tyr

20 25 30

Arg Ile Thr Tyr Gly Glu Thr Gly Gly Asn Ser Pro Val Gln Glu Phe

35 40 45
 Thr Val Pro Ser Ser Tyr Pro Thr Ala Thr Ile Ser Gly Leu Lys Pro
 50 55 60
 Gly Val Asp Tyr Thr Ile Thr Val Tyr Ala Val Thr Gln Thr Asn Met
 5 65 70 75 80
 His Tyr Leu Met His Tyr Pro Ile Ser Ile Asn Tyr Arg Thr
 85 90
 <210> 105
 <211> 94
 10 <212> PRT
 <213> Sequência artificial
 <220>
 <223> Descrição de Sequência artificial: polipeptídeo sintético
 <400> 105
 15 Val Ser Asp Val Pro Arg Asp Leu Glu Val Val Ala Ala Thr Pro Thr
 1 5 10 15
 Ser Leu Leu Ile Ser Trp Asp Tyr Asp Arg Ser Lys Tyr Arg Tyr Tyr
 20 25 30
 Arg Ile Thr Tyr Gly Glu Thr Gly Gly Asn Ser Pro Val Gln Glu Phe
 20 35 40 45
 Thr Val Pro Ala Ser Tyr Pro Thr Ala Thr Ile Ser Gly Leu Lys Pro
 50 55 60
 Gly Val Asp Tyr Thr Ile Thr Val Tyr Ala Val Thr Gln Lys Asp Ile
 65 70 75 80
 25 Tyr Tyr Tyr Ile Tyr Asn Pro Ile Ser Ile Asn Tyr Arg Thr
 85 90
 <210> 106
 <211> 94
 <212> PRT
 30 <213> Sequência artificial
 <220>
 <223> Descrição de Sequência artificial: polipeptídeo sintético

<400> 106

Val Ser Asp Val Pro Arg Asp Leu Glu Val Val Ala Ala Thr Pro Thr

1 5 10 15

Ser Leu Leu Ile Ser Trp Tyr Tyr Met Pro His Arg Asn Arg Tyr Tyr

5 20 25 30

Arg Ile Thr Tyr Gly Glu Thr Gly Gly Asn Ser Pro Val Gln Glu Phe

35 40 45

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

50 55 60

10 Gly Val Asp Tyr Thr Ile Thr Val Tyr Ala Val Thr Asn His His Val

65 70 75 80

His Arg Leu Met His Ile Pro Ile Ser Ile Asn Tyr Arg Thr

85 90

<210> 107

15 <211> 93

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Descrição de Sequência artificial: polipeptídeo sintético

20 <400> 107

Val Ser Asp Val Pro Arg Asp Leu Glu Val Val Ala Ala Thr Pro Thr

1 5 10 15

Ser Leu Leu Ile Ser Trp Ser Ser His Leu Pro Tyr Asp Arg Tyr Tyr

20 25 30

25 Arg Ile Thr Tyr Gly Glu Thr Gly Gly Asn Ser Pro Val Gln Glu Phe

35 40 45

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

50 55 60

Val Asp Tyr Thr Ile Thr Val Tyr Ala Val Thr Thr Lys Gly Val His

30 65 70 75 80

Tyr Leu Phe His Ser Pro Ile Ser Ile Asn Tyr Arg Thr

85 90

<210> 108
 <211> 94
 <212> PRT
 <213> Sequência artificial
 5 <220>
 <223> Descrição de Sequência artificial: polipeptídeo sintético
 <400> 108
 Val Ser Asp Val Pro Arg Asp Leu Glu Val Val Ala Ala Thr Pro Thr
 1 5 10 15
 10 Ser Leu Leu Ile Ser Trp Gln Tyr Asp Arg Ser Ser Tyr Arg Tyr Tyr
 20 25 30
 Arg Ile Thr Tyr Gly Glu Thr Gly Gly Asn Ser Pro Val Gln Glu Phe
 35 40 45
 Thr Val Pro Ala Ser Tyr Pro Thr Ala Thr Ile Ser Gly Leu Lys Pro
 15 50 55 60
 Gly Val Asp Tyr Thr Ile Thr Val Tyr Ala Val Thr Arg Val Gly Thr
 65 70 75 80
 Tyr Gln Tyr Tyr Tyr Leu Pro Ile Ser Ile Asn Tyr Arg Thr
 85 90
 20 <210> 109
 <211> 93
 <212> PRT
 <213> Sequência artificial
 <220>
 25 <223> Descrição de Sequência artificial: polipeptídeo sintético
 <400> 109
 Val Ser Asp Val Pro Arg Asp Leu Glu Val Val Ala Ala Thr Pro Thr
 1 5 10 15
 Ser Leu Leu Ile Ser Trp Tyr Thr Pro Tyr Lys Tyr Ser Arg Tyr Tyr
 30 20 25 30
 Arg Ile Thr Tyr Gly Glu Thr Gly Gly Asn Ser Pro Val Gln Glu Phe
 35 40 45

Thr Val Pro Ser His Ser Thr Ala Thr Ile Ser Gly Leu Lys Pro Gly
 50 55 60
 Val Asp Tyr Thr Ile Thr Val Tyr Ala Val Thr Val Gly Asn Met Tyr
 65 70 75 80
 5 Leu Ser Ile Val Pro Pro Ile Ser Ile Asn Tyr Arg Thr
 85 90
 <210> 110
 <211> 94
 <212> PRT
 10 <213> Sequência artificial
 <220>
 <223> Descrição de Sequência artificial: polipeptídeo sintético
 <400> 110
 Val Ser Asp Val Pro Arg Asp Leu Glu Val Val Ala Ala Thr Pro Thr
 15 1 5 10 15
 Ser Leu Leu Ile Ser Trp Ser Asp Ser Leu Lys Val Ser Arg Tyr Tyr
 20 25 30
 Arg Ile Thr Tyr Gly Glu Thr Gly Gly Asn Ser Pro Val Gln Glu Phe
 35 40 45
 20 Thr Val Pro Lys Gln Tyr His Thr Ala Thr Ile Ser Gly Leu Lys Pro
 50 55 60
 Gly Val Asp Tyr Thr Ile Thr Val Tyr Ala Val Thr Pro Ser Asn Ile
 65 70 75 80
 Ile Gly Arg His Tyr Gly Pro Ile Ser Ile Asn Tyr Arg Thr
 25 85 90
 <210> 111
 <211> 90
 <212> PRT
 <213> Sequência artificial
 30 <220>
 <223> Descrição de Sequência artificial: polipeptídeo sintético
 <400> 111

Val Ser Asp Val Pro Arg Asp Leu Glu Val Val Ala Ala Thr Pro Thr
 1 5 10 15
 Ser Leu Leu Ile Ser Trp Ser Ala Arg Leu Lys Val Ala Arg Tyr Tyr
 20 25 30
 5 Arg Ile Thr Tyr Gly Glu Thr Gly Gly Asn Ser Pro Val Gln Glu Phe
 35 40 45
 Thr Val Pro Lys Asn Val Tyr Thr Ala Thr Ile Ser Gly Leu Lys Pro
 50 55 60
 Gly Val Asp Tyr Thr Ile Thr Val Tyr Ala Val Thr Lys Met Arg Asp
 10 65 70 75 80
 Tyr Arg Pro Ile Ser Ile Asn Tyr Arg Thr
 85 90
 <210> 112
 <211> 90
 15 <212> PRT
 <213> Sequência artificial
 <220>
 <223> Descrição de Sequência artificial: polipeptídeo sintético
 <400> 112
 20 Val Ser Asp Val Pro Arg Asp Leu Glu Val Val Ala Ala Thr Pro Thr
 1 5 10 15
 Ser Leu Leu Ile Ser Trp Ser Thr Ala Leu Lys Val Gln Arg Tyr Tyr
 20 25 30
 Arg Ile Thr Tyr Gly Glu Thr Gly Gly Asn Ser Pro Val Gln Glu Phe
 35 40 45
 25 Thr Val Pro Lys His Ser His Thr Ala Thr Ile Ser Gly Leu Lys Pro
 50 55 60
 Gly Val Asp Tyr Thr Ile Thr Val Tyr Ala Val Thr Lys Met Arg Asp
 65 70 75 80
 30 Tyr Arg Pro Ile Ser Ile Asn Tyr Arg Thr
 85 90
 <210> 113

<211> 93

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

5 <223> Descrição de Sequência artificial: polipeptídeo sintético

<400> 113

Val Ser Asp Val Pro Arg Asp Leu Glu Val Val Ala Ala Thr Pro Thr

1 5 10 15

Ser Leu Leu Ile Ser Trp Pro Thr His Tyr Lys Val Ala Arg Tyr Tyr

10 20 25 30

Arg Ile Thr Tyr Gly Glu Thr Gly Gly Asn Ser Pro Val Gln Glu Phe

35 40 45

Thr Val Pro Lys His Thr Tyr Thr Ala Thr Ile Ser Gly Leu Lys Pro

50 55 60

15 Gly Val Asp Tyr Thr Ile Thr Val Tyr Ala Val Thr Thr Thr Lys Gly

65 70 75 80

Leu Arg His Tyr Gly Pro Ile Ser Ile Asn Tyr Arg Thr

85 90

<210> 114

20 <211> 90

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Descrição de Sequência artificial: polipeptídeo sintético

25 <400> 114

Val Ser Asp Val Pro Arg Asp Leu Glu Val Val Ala Ala Thr Pro Thr

1 5 10 15

Ser Leu Leu Ile Ser Trp Ser Asp Lys Leu Lys Val Gln Arg Tyr Tyr

20 25 30

30 Arg Ile Thr Tyr Gly Glu Thr Gly Gly Asn Ser Pro Val Gln Glu Phe

35 40 45

Thr Val Pro Lys His Asp Arg Thr Ala Thr Ile Ser Gly Leu Lys Pro

	50	55	60
	Gly Val Asp Tyr Thr Ile Thr Val Tyr Ala Val Thr Lys Met Arg Asp		
	65	70	75 80
	Tyr Arg Pro Ile Ser Ile Asn Tyr Arg Thr		
5	85	90	
	<210> 115		
	<211> 94		
	<212> PRT		
	<213> Sequência artificial		
10	<220>		
	<223> Descrição de Sequência artificial: polipeptídeo sintético		
	<400> 115		
	Val Ser Asp Val Pro Arg Asp Leu Glu Val Val Ala Ala Thr Pro Thr		
	1 5 10 15		
15	Ser Leu Leu Ile Ser Trp Ser Lys Arg Leu Gln Val Ser Arg Tyr Tyr		
	20 25 30		
	Arg Ile Thr Tyr Gly Glu Thr Gly Gly Asn Ser Pro Val Gln Glu Phe		
	35 40 45		
	Thr Val Pro Tyr Asn Tyr Lys Thr Ala Thr Ile Ser Gly Leu Lys Pro		
20	50 55 60		
	Gly Val Asp Tyr Thr Ile Thr Val Tyr Ala Val Thr Pro Ser Asn Ile		
	65 70 75 80		
	Ile Gly Arg His Tyr Gly Pro Ile Ser Ile Asn Tyr Arg Thr		
	85 90		
25	<210> 116		
	<211> 94		
	<212> PRT		
	<213> Sequência artificial		
	<220>		
30	<223> Descrição de Sequência artificial: polipeptídeo sintético		
	<400> 116		
	Val Ser Asp Val Pro Arg Asp Leu Glu Val Val Ala Ala Thr Pro Thr		

1 5 10 15
 Ser Leu Leu Ile Ser Trp Ser Asn Arg Leu Val Val Lys Arg Tyr Tyr
 20 25 30
 Arg Ile Thr Tyr Gly Glu Thr Gly Gly Asn Ser Pro Val Gln Glu Phe
 5 35 40 45
 Thr Val Pro His Gln Met Lys Thr Ala Thr Ile Ser Gly Leu Lys Pro
 50 55 60
 Gly Val Asp Tyr Thr Ile Thr Val Tyr Ala Val Thr Pro Gly Gly Tyr
 65 70 75 80
 10 Ser Gly Arg Asn Tyr Gly Pro Ile Ser Ile Asn Tyr Arg Thr
 85 90
 <210> 117
 <211> 90
 <212> PRT
 15 <213> Sequência artificial
 <220>
 <223> Descrição de Sequência artificial: polipeptídeo sintético
 <400> 117
 Val Ser Asp Val Pro Arg Asp Leu Glu Val Val Ala Ala Thr Pro Thr
 20 1 5 10 15
 Ser Leu Leu Ile Ser Trp Ser Glu Asn Leu Arg Val Gln Arg Tyr Tyr
 20 25 30
 Arg Ile Thr Tyr Gly Glu Thr Gly Gly Asn Ser Pro Val Gln Glu Phe
 35 40 45
 25 Thr Val Pro Ser Ser Val His Thr Ala Thr Ile Ser Gly Leu Lys Pro
 50 55 60
 Gly Val Asp Tyr Thr Ile Thr Val Tyr Ala Val Thr Lys Met Arg Asp
 65 70 75 80
 Tyr Arg Pro Ile Ser Ile Asn Tyr Arg Thr
 30 85 90
 <210> 118
 <211> 94

<212> PRT
 <213> Sequência artificial
 <220>
 <223> Descrição de Sequência artificial: polipeptídeo sintético
 5 <400> 118
 Val Ser Asp Val Pro Arg Asp Leu Glu Val Val Ala Ala Thr Pro Thr
 1 5 10 15
 Ser Leu Leu Ile Ser Trp Ser Ser Asn Leu Val Val Lys Arg Tyr Tyr
 20 25 30
 10 Arg Ile Thr Tyr Gly Glu Thr Gly Gly Asn Ser Pro Val Gln Glu Phe
 35 40 45
 Thr Val Pro Lys Asp Pro Ser Thr Ala Thr Ile Ser Gly Leu Lys Pro
 50 55 60
 Gly Val Asp Tyr Thr Ile Thr Val Tyr Ala Val Thr Asp Tyr Glu Met
 15 65 70 75 80
 Lys Pro Arg Asn Tyr Gly Pro Ile Ser Ile Asn Tyr Arg Thr
 85 90
 <210> 119
 <211> 94
 20 <212> PRT
 <213> Sequência artificial
 <220>
 <223> Descrição de Sequência artificial: polipeptídeo sintético
 <400> 119
 25 Val Ser Asp Val Pro Arg Asp Leu Glu Val Val Ala Ala Thr Pro Thr
 1 5 10 15
 Ser Leu Leu Ile Ser Trp Pro Thr His Tyr Lys Val Ala Arg Tyr Tyr
 20 25 30
 Arg Ile Thr Tyr Gly Glu Thr Gly Gly Asn Ser Pro Val Gln Glu Phe
 35 40 45
 30 Thr Val Pro Lys His Glu Ser Thr Ala Thr Ile Ser Gly Leu Lys Pro
 50 55 60

Gly Val Asp Tyr Thr Ile Thr Val Tyr Ala Val Thr Leu Asn Val Ala
 65 70 75 80
 Tyr Ser Arg Glu Val Arg Pro Ile Ser Ile Asn Tyr Arg Thr
 85 90

5 <210> 120

<211> 95

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

10 <223> Descrição de Sequência artificial: polipeptídeo sintético

<400> 120

Val Ser Asp Val Pro Arg Asp Leu Glu Val Val Ala Ala Thr Pro Thr

1 5 10 15

Ser Leu Leu Ile Ser Trp Pro Asp His Val Lys Val Gln Arg Tyr Tyr

15 20 25 30

Arg Ile Thr Tyr Gly Glu Thr Gly Gly Asn Ser Pro Val Gln Glu Phe

35 40 45

Thr Val Pro Gln His Ser Arg Thr Ala Thr Ile Ser Gly Leu Lys Pro

50 55 60

20 Gly Val Asp Tyr Thr Ile Thr Val Tyr Ala Val Thr Tyr Thr Gly Tyr

65 70 75 80

Gly Thr Glu Arg Asn Tyr Gln Pro Ile Ser Ile Asn Tyr Arg Thr

85 90 95

<210> 121

25 <211> 94

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Descrição de Sequência artificial: polipeptídeo sintético

30 <400> 121

Val Ser Asp Val Pro Arg Asp Leu Glu Val Val Ala Ala Thr Pro Thr

1 5 10 15

Ser Leu Leu Ile Ser Trp Gly Ser His Leu Arg Val Ser Arg Tyr Tyr
 20 25 30
 Arg Ile Thr Tyr Gly Glu Thr Gly Gly Asn Ser Pro Val Gln Glu Phe
 35 40 45
 5 Thr Val Pro Tyr Asp Ser His Thr Ala Thr Ile Ser Gly Leu Lys Pro
 50 55 60
 Gly Val Asp Tyr Thr Ile Thr Val Tyr Ala Val Thr Gln Gly Pro Asn
 65 70 75 80
 Arg Gly Arg Asn Tyr Gln Pro Ile Ser Ile Asn Tyr Arg Thr
 10 85 90
 <210> 122
 <211> 90
 <212> PRT
 <213> Sequência artificial
 15 <220>
 <223> Descrição de Sequência artificial: polipeptídeo sintético
 <400> 122
 Val Ser Asp Val Pro Arg Asp Leu Glu Val Val Ala Ala Thr Pro Thr
 1 5 10 15
 20 Ser Leu Leu Ile Ser Trp Gly Lys His Leu Val Val Gln Arg Tyr Tyr
 20 25 30
 Arg Ile Thr Tyr Gly Glu Thr Gly Gly Asn Ser Pro Val Gln Glu Phe
 35 40 45
 Thr Val Pro Arg Gly His Tyr Thr Ala Thr Ile Ser Gly Leu Lys Pro
 25 50 55 60
 Gly Val Asp Tyr Thr Ile Thr Val Tyr Ala Val Thr Lys Met Arg Asp
 65 70 75 80
 Tyr Arg Pro Ile Ser Ile Asn Tyr Arg Thr
 85 90
 30 <210> 123
 <211> 93
 <212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Descrição de Sequência artificial: polipeptídeo sintético

<400> 123

5 Val Ser Asp Val Pro Arg Asp Leu Glu Val Val Ala Ala Thr Pro Thr
1 5 10 15
Ser Leu Leu Ile Ser Trp Thr Thr Asn Leu Gln Val Ser Arg Tyr Tyr
20 25 30
Arg Ile Thr Tyr Gly Glu Thr Gly Gly Asn Ser Pro Val Gln Glu Phe
10 35 40 45
Thr Val Pro Lys Ala Asn Thr Thr Ala Thr Ile Ser Gly Leu Lys Pro
50 55 60
Gly Val Asp Tyr Thr Ile Thr Val Tyr Ala Val Thr Val Ser Lys Gly
65 70 75 80
15 Asn Arg Ser Tyr Gly Pro Ile Ser Ile Asn Tyr Arg Thr
85 90

<210> 124

<211> 94

<212> PRT

20 <213> Sequência artificial

<220>

<223> Descrição de Sequência artificial: polipeptídeo sintético

<400> 124

25 Val Ser Asp Val Pro Arg Asp Leu Glu Val Val Ala Ala Thr Pro Thr
1 5 10 15
Ser Leu Leu Ile Ser Trp Ala Glu His Leu Gln Val Ser Arg Tyr Tyr
20 25 30
Arg Ile Thr Tyr Gly Glu Thr Gly Gly Asn Ser Pro Val Gln Glu Phe
35 40 45
30 Thr Val Pro Arg Gly Val Tyr Thr Ala Thr Ile Ser Gly Leu Lys Pro
50 55 60
Gly Val Asp Tyr Thr Ile Thr Val Tyr Ala Val Thr Pro Ser Asn Ile

65 70 75 80
 Ile Gly Arg His Tyr Gly Pro Ile Ser Ile Asn Tyr Arg Thr
 85 90

5 <210> 125
 <211> 90
 <212> PRT
 <213> Sequência artificial
 <220>
 <223> Descrição de Sequência artificial: polipeptídeo sintético

10 <400> 125
 Val Ser Asp Val Pro Arg Asp Leu Glu Val Val Ala Ala Thr Pro Thr
 1 5 10 15
 Ser Leu Leu Ile Ser Trp Pro Gln His Leu Arg Val Gln Arg Tyr Tyr
 20 25 30
 15 Arg Ile Thr Tyr Gly Glu Thr Gly Gly Asn Ser Pro Val Gln Glu Phe
 35 40 45
 Thr Val Pro Arg Gly Ser Asp Thr Ala Thr Ile Ser Gly Leu Lys Pro
 50 55 60
 Gly Val Asp Tyr Thr Ile Thr Val Tyr Ala Val Thr Lys Met Arg Asp
 20 65 70 75 80
 Tyr Arg Pro Ile Ser Ile Asn Tyr Arg Thr
 85 90

25 <210> 126
 <211> 94
 <212> PRT
 <213> Sequência artificial
 <220>
 <223> Descrição de Sequência artificial: polipeptídeo sintético
 <400> 126

30 Val Ser Asp Val Pro Arg Asp Leu Glu Val Val Ala Ala Thr Pro Thr
 1 5 10 15
 Ser Leu Leu Ile Ser Trp Arg His Pro His Phe Pro Thr Arg Tyr Tyr

20 25 30
 Arg Ile Thr Tyr Gly Glu Thr Gly Gly Asn Ser Pro Val Gln Glu Phe
 35 40 45
 Thr Val Pro Leu Gln Pro Pro Thr Ala Thr Ile Ser Gly Leu Lys Pro
 5 50 55 60
 Gly Val Asp Tyr Thr Ile Thr Val Tyr Ala Val Thr Glu Gly Pro Asn
 65 70 75 80
 Glu Arg Ser Leu Phe Ile Pro Ile Ser Ile Asn Tyr Arg Thr
 85 90
 10 <210> 127
 <211> 86
 <212> PRT
 <213> Sequência artificial
 <220>
 15 <223> Descrição de Sequência artificial: polipeptídeo sintético
 <400> 127
 Glu Val Val Ala Ala Thr Pro Thr Ser Leu Leu Ile Ser Trp Arg His
 1 5 10 15
 Pro His Phe Pro Thr Arg Tyr Tyr Arg Ile Thr Tyr Gly Glu Thr Gly
 20 20 25 30
 Gly Asn Ser Pro Val Gln Glu Phe Thr Val Pro Leu Gln Pro Pro Thr
 35 40 45
 Ala Thr Ile Ser Gly Leu Lys Pro Gly Val Asp Tyr Thr Ile Thr Val
 50 55 60
 25 Tyr Ala Val Thr Glu Gly Pro Asn Glu Arg Ser Leu Phe Ile Pro Ile
 65 70 75 80
 Ser Ile Asn Tyr Arg Thr
 85
 <210> 128
 30 <211> 94
 <212> PRT
 <213> Sequência artificial

<220>

<223> Descrição de Sequência artificial: polipeptídeo sintético

<400> 128

Gly Glu Val Val Ala Ala Thr Pro Thr Ser Leu Leu Ile Ser Trp Arg

5 1 5 10 15

His Pro His Phe Pro Thr Arg Tyr Tyr Arg Ile Thr Tyr Gly Glu Thr

20 25 30

Gly Gly Asn Ser Pro Val Gln Glu Phe Thr Val Pro Leu Gln Pro Pro

35 40 45

10 Thr Ala Thr Ile Ser Gly Leu Lys Pro Gly Val Asp Tyr Thr Ile Thr

50 55 60

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

65 70 75 80

Ile Ser Ile Asn Tyr Arg Thr Glu Ile Asp Lys Pro Cys Gln

15 85 90

<210> 129

<211> 86

<212> PRT

<213> Sequência artificial

20 <220>

<223> Descrição de Sequência artificial: polipeptídeo sintético

<400> 129

Glu Val Val Ala Ala Thr Pro Thr Ser Leu Leu Ile Ser Trp Arg His

1 5 10 15

25 Pro His Phe Pro Thr Arg Tyr Tyr Arg Ile Thr Tyr Gly Glu Thr Gly

20 25 30

Gly Asn Ser Pro Val Gln Glu Phe Thr Val Pro Leu Gln Pro Pro Thr

35 40 45

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

30 50 55 60

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

65 70 75 80

Ser Ile Asn Tyr Arg Thr

85

<210> 130

<211> 86

5 <212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Descrição de Sequência artificial: polipeptídeo sintético

<400> 130

10 Glu Val Val Ala Ala Thr Pro Thr Ser Leu Leu Ile Ser Trp Arg His

1 5 10 15

Pro His Phe Pro Thr Arg Tyr Tyr Arg Ile Thr Tyr Gly Glu Thr Gly

20 25 30

Gly Asn Ser Pro Val Gln Glu Phe Thr Val Pro Leu Gln Pro Pro Thr

15 35 40 45

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

50 55 60

Tyr Ala Val Thr Met Gly Leu Tyr Gly His Glu Leu Leu Thr Pro Ile

65 70 75 80

20 Ser Ile Asn Tyr Arg Thr

85

<210> 131

<211> 86

<212> PRT

25 <213> Sequência artificial

<220>

<223> Descrição de Sequência artificial: polipeptídeo sintético

<400> 131

Glu Val Val Ala Ala Thr Pro Thr Ser Leu Leu Ile Ser Trp Arg His

30 1 5 10 15

Pro His Phe Pro Thr Arg Tyr Tyr Arg Ile Thr Tyr Gly Glu Thr Gly

20 25 30

Gly Asn Ser Pro Val Gln Glu Phe Thr Val Pro Leu Gln Pro Pro Thr
 35 40 45
 Ala Thr Ile Ser Gly Leu Lys Pro Gly Val Asp Tyr Thr Ile Thr Gly
 50 55 60
 5 Tyr Ala Val Thr Asp Gly Glu Asn Gly Gln Phe Leu Leu Val Pro Ile
 65 70 75 80
 Ser Ile Asn Tyr Arg Thr
 85
 <210> 132
 10 <211> 86
 <212> PRT
 <213> Sequência artificial
 <220>
 <223> Descrição de Sequência artificial: polipeptídeo sintético
 15 <400> 132
 Glu Val Val Ala Ala Thr Pro Thr Ser Leu Leu Ile Ser Trp Arg His
 1 5 10 15
 Pro His Phe Pro Thr Arg Tyr Tyr Arg Ile Thr Tyr Gly Glu Thr Gly
 20 25 30
 20 Gly Asn Ser Pro Val Gln Glu Phe Thr Val Pro Leu Gln Pro Pro Thr
 35 40 45
 Ala Thr Ile Ser Gly Leu Lys Pro Gly Val Asp Tyr Thr Ile Thr Gly
 50 55 60
 Tyr Ala Val Thr Met Gly Pro Asn Asp Asn Glu Leu Leu Thr Pro Ile
 65 70 75 80
 25 Ser Ile Asn Tyr Arg Thr
 85
 <210> 133
 <211> 86
 30 <212> PRT
 <213> Sequência artificial
 <220>

<223> Descrição de Sequência artificial: polipeptídeo sintético

<400> 133

Glu Val Val Ala Ala Thr Pro Thr Ser Leu Leu Ile Ser Trp Arg His

1 5 10 15

5 Pro His Phe Pro Thr Arg Tyr Tyr Arg Ile Thr Tyr Gly Glu Thr Gly

20 25 30

Gly Asn Ser Pro Val Gln Glu Phe Thr Val Pro Leu Gln Pro Pro Thr

35 40 45

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

10 50 55 60

Tyr Ala Val Thr Ala Gly Trp Asp Asp His Glu Leu Phe Ile Pro Ile

65 70 75 80

Ser Ile Asn Tyr Arg Thr

85

15 <210> 134

<211> 86

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

20 <223> Descrição de Sequência artificial: polipeptídeo sintético

<400> 134

Glu Val Val Ala Ala Thr Pro Thr Ser Leu Leu Ile Ser Trp Arg His

1 5 10 15

Pro His Phe Pro Thr Arg Tyr Tyr Arg Ile Thr Tyr Gly Glu Thr Gly

25 20 25 30

Gly Asn Ser Pro Val Gln Glu Phe Thr Val Pro Leu Gln Pro Pro Thr

35 40 45

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

50 55 60

30 Tyr Ala Val Thr Ser Gly His Asn Asp His Met Leu Met Ile Pro Ile

65 70 75 80

Ser Ile Asn Tyr Arg Thr

85

<210> 135

<211> 86

<212> PRT

5 <213> Sequência artificial

<220>

<223> Descrição de Sequência artificial: polipeptídeo sintético

<400> 135

10 1 5 10 15

Pro His Phe Pro Thr Arg Tyr Tyr Arg Ile Thr Tyr Gly Glu Thr Gly

20 25 30

Gly Asn Ser Pro Val Gln Glu Phe Thr Val Pro Leu Gln Pro Pro Thr

35 40 45

15 Ala Thr Ile Ser Gly Leu Lys Pro Gly Val Asp Tyr Thr Ile Thr Gly

50 55 60

Tyr Ala Val Thr Ala Gly Tyr Asn Asp Gln Ile Leu Met Thr Pro Ile

65 70 75 80

Ser Ile Asn Tyr Arg Thr

20 85

<210> 136

<211> 86

<212> PRT

<213> Sequência artificial

25 <220>

<223> Descrição de Sequência artificial: polipeptídeo sintético

<400> 136

Glu Val Val Ala Ala Thr Pro Thr Ser Leu Leu Ile Ser Trp Arg His

30 1 5 10 15

Pro His Phe Pro Thr Arg Tyr Tyr Arg Ile Thr Tyr Gly Glu Thr Gly

20 25 30

Gly Asn Ser Pro Val Gln Glu Phe Thr Val Pro Leu Gln Pro Pro Thr

35 40 45
 Ala Thr Ile Ser Gly Leu Lys Pro Gly Val Asp Tyr Thr Ile Thr Gly
 50 55 60
 Tyr Ala Val Thr Phe Gly Leu Tyr Gly Lys Glu Leu Leu Ile Pro Ile
 5 65 70 75 80
 Ser Ile Asn Tyr Arg Thr
 85
 <210> 137
 <211> 86
 10 <212> PRT
 <213> Sequência artificial
 <220>
 <223> Descrição de Sequência artificial: polipeptídeo sintético
 <400> 137
 15 Glu Val Val Ala Ala Thr Pro Thr Ser Leu Leu Ile Ser Trp Arg His
 1 5 10 15
 Pro His Phe Pro Thr Arg Tyr Tyr Arg Ile Thr Tyr Gly Glu Thr Gly
 20 25 30
 Gly Asn Ser Pro Val Gln Glu Phe Thr Val Pro Leu Gln Pro Pro Thr
 20 35 40 45
 Ala Thr Ile Ser Gly Leu Lys Pro Gly Val Asp Tyr Thr Ile Thr Gly
 50 55 60
 Tyr Ala Val Thr Thr Gly Pro Asn Asp Arg Leu Leu Phe Val Pro Ile
 65 70 75 80
 25 Ser Ile Asn Tyr Arg Thr
 85
 <210> 138
 <211> 86
 <212> PRT
 30 <213> Sequência artificial
 <220>
 <223> Descrição de Sequência artificial: polipeptídeo sintético

<400> 138

Glu Val Val Ala Ala Thr Pro Thr Ser Leu Leu Ile Ser Trp Arg His
 1 5 10 15
 Pro His Phe Pro Thr Arg Tyr Tyr Arg Ile Thr Tyr Gly Glu Thr Gly
 5 20 25 30
 Gly Asn Ser Pro Val Gln Glu Phe Thr Val Pro Leu Gln Pro Pro Thr
 35 40 45
 Ala Thr Ile Ser Gly Leu Lys Pro Gly Val Asp Tyr Thr Ile Thr Gly
 50 55 60
 10 Tyr Ala Val Thr Asp Val Tyr Asn Asp His Glu Ile Lys Thr Pro Ile
 65 70 75 80
 Ser Ile Asn Tyr Arg Thr
 85

<210> 139

15 <211> 86

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Descrição de Sequência artificial: polipeptídeo sintético

20 <400> 139

Glu Val Val Ala Ala Thr Pro Thr Ser Leu Leu Ile Ser Trp Arg His
 1 5 10 15
 Pro His Phe Pro Thr Arg Tyr Tyr Arg Ile Thr Tyr Gly Glu Thr Gly
 20 25 30
 25 Gly Asn Ser Pro Val Gln Glu Phe Thr Val Pro Leu Gln Pro Pro Thr
 35 40 45
 Ala Thr Ile Ser Gly Leu Lys Pro Gly Val Asp Tyr Thr Ile Thr Gly
 50 55 60
 Tyr Ala Val Thr Asp Gly Lys Asp Gly Arg Val Leu Leu Thr Pro Ile
 30 65 70 75 80
 Ser Ile Asn Tyr Arg Thr
 85

* <210> 140
 <211> 86
 <212> PRT
 <213> Sequência artificial
 5 <220>
 <223> Descrição de Sequência artificial: polipeptídeo sintético
 <400> 140
 Glu Val Val Ala Ala Thr Pro Thr Ser Leu Leu Ile Ser Trp Arg His
 1 5 10 15
 10 Pro His Phe Pro Thr Arg Tyr Tyr Arg Ile Thr Tyr Gly Glu Thr Gly
 20 25 30
 Gly Asn Ser Pro Val Gln Glu Phe Thr Val Pro Leu Gln Pro Pro Thr
 35 40 45
 Ala Thr Ile Ser Gly Leu Lys Pro Gly Val Asp Tyr Thr Ile Thr Gly
 15 50 55 60
 Tyr Ala Val Thr Glu Val His His Asp Arg Glu Ile Lys Thr Pro Ile
 65 70 75 80
 Ser Ile Asn Tyr Arg Thr
 85
 * 20 <210> 141
 <211> 86
 <212> PRT
 <213> Sequência artificial
 <220>
 25 <223> Descrição de Sequência artificial: polipeptídeo sintético
 <400> 141
 Glu Val Val Ala Ala Thr Pro Thr Ser Leu Leu Ile Ser Trp Arg His
 1 5 10 15
 Pro His Phe Pro Thr Arg Tyr Tyr Arg Ile Thr Tyr Gly Glu Thr Gly
 20 25 30
 Gly Asn Ser Pro Val Gln Glu Phe Thr Val Pro Leu Gln Pro Pro Thr
 35 40 45

Ala Thr Ile Ser Gly Leu Lys Pro Gly Val Asp Tyr Thr Ile Thr Gly
50 55 60
Tyr Ala Val Thr Gln Ala Pro Asn Asp Arg Val Leu Tyr Thr Pro Ile
65 70 75 80
5 Ser Ile Asn Tyr Arg Thr
85
<210> 142
<211> 86
<212> PRT
10 <213> Sequência artificial
<220>
<223> Descrição de Sequência artificial: polipeptídeo sintético
<400> 142
Glu Val Val Ala Ala Thr Pro Thr Ser Leu Leu Ile Ser Trp Arg His
15 1 5 10 15
Pro His Phe Pro Thr Arg Tyr Tyr Arg Ile Thr Tyr Gly Glu Thr Gly
20 20 25 30
Gly Asn Ser Pro Val Gln Glu Phe Thr Val Pro Leu Gln Pro Pro Thr
35 40 45
20 Ala Thr Ile Ser Gly Leu Lys Pro Gly Val Asp Tyr Thr Ile Thr Gly
50 55 60
Tyr Ala Val Thr Arg Glu Glu Asn Asp His Glu Leu Leu Ile Pro Ile
65 70 75 80
Ser Ile Asn Tyr Arg Thr
25 85
<210> 143
<211> 86
<212> PRT
<213> Sequência artificial
30 <220>
<223> Descrição de Sequência artificial: polipeptídeo sintético
<400> 143

10

<211> 86

15

<213> Seqüência artificial

<223> Descrição de Seqüência artificial: polipeptídeo sintético

<400> 144

25

<210> 145

<211> 94

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

5 <223> Descrição de Sequência artificial: polipeptídeo sintético

<400> 145

Val Ser Asp Val Pro Arg Asp Leu Glu Val Val Ala Ala Thr Pro Thr
1 5 10 15

Ser Leu Leu Ile Ser Trp Arg His Pro His Phe Pro Thr Arg Tyr Tyr

10 20 25 30

Arg Ile Thr Tyr Gly Glu Thr Gly Gly Asn Ser Pro Val Gln Glu Phe
35 40 45

Thr Val Pro Leu Gln Pro Pro Thr Ala Thr Ile Ser Gly Leu Lys Pro
50 55 60

15 Gly Val Asp Tyr Thr Ile Thr Gly Tyr Ala Val Thr Val Ala Gln Asn
65 70 75 80

Asp His Glu Leu Ile Thr Pro Ile Ser Ile Asn Tyr Arg Thr

85 90

<210> 146

20 <211> 95

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Descrição de Sequência artificial: polipeptídeo sintético

25 <400> 146

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

Thr Ser Leu Leu Ile Ser Trp Arg His Pro His Phe Pro Thr Arg Tyr

20 25 30

30 Tyr Arg Ile Thr Tyr Gly Glu Thr Gly Gly Asn Ser Pro Val Gln Glu
35 40 45

Phe Thr Val Pro Leu Gln Pro Pro Ala Ala Thr Ile Ser Gly Leu Lys

50 55 60
 Pro Gly Val Asp Tyr Thr Ile Thr Gly Tyr Ala Val Thr Met Ala Gln
 65 70 75 80
 Ser Gly His Glu Leu Phe Thr Pro Ile Ser Ile Asn Tyr Arg Thr
 5 85 90 95
 <210> 147
 <211> 86
 <212> PRT
 <213> Sequência artificial
 10 <220>
 <223> Descrição de Sequência artificial: polipeptídeo sintético
 <400> 147
 Glu Val Val Ala Ala Thr Pro Thr Ser Leu Leu Ile Ser Trp Arg His
 1 5 10 15
 15 Pro His Phe Pro Thr Arg Tyr Tyr Arg Ile Thr Tyr Gly Glu Thr Gly
 20 25 30
 Gly Asn Ser Pro Val Gln Glu Phe Thr Val Pro Leu Gln Pro Pro Thr
 35 40 45
 Ala Thr Ile Ser Gly Leu Lys Pro Gly Val Asp Tyr Thr Ile Thr Gly
 20 50 55 60
 Tyr Ala Val Thr Val Glu Arg Asn Gly Arg Val Leu Met Thr Pro Ile
 65 70 75 80
 Ser Ile Asn Tyr Arg Thr
 85
 25 <210> 148
 <211> 86
 <212> PRT
 <213> Sequência artificial
 <220>
 30 <223> Descrição de Sequência artificial: polipeptídeo sintético
 <400> 148
 Glu Val Val Ala Ala Thr Pro Thr Ser Leu Leu Ile Ser Trp Arg His

1 5 10 15
Pro His Phe Pro Thr Arg Tyr Tyr Arg Ile Thr Tyr Gly Glu Thr Gly
20 25 30
Gly Asn Ser Pro Val Gln Glu Phe Thr Val Pro Leu Gln Pro Pro Thr
5 35 40 45
Ala Thr Ile Ser Gly Leu Lys Pro Gly Val Asp Tyr Thr Ile Thr Gly
50 55 60
Tyr Ala Val Thr Val Glu Arg Asn Gly Arg His Leu Met Thr Pro Ile
65 70 75 80
10 Ser Ile Asn Tyr Arg Thr
85
<210> 149
<211> 86
<212> PRT
15 <213> Sequência artificial
<220>
<223> Descrição de Sequência artificial: polipeptídeo sintético
<400> 149
Glu Val Val Ala Ala Thr Pro Thr Ser Leu Leu Ile Ser Trp Arg His
20 1 5 10 15
Pro His Phe Pro Thr Arg Tyr Tyr Arg Ile Thr Tyr Gly Glu Thr Gly
20 25 30
Gly Asn Ser Pro Val Gln Glu Phe Thr Val Pro Leu Gln Pro Pro Thr
35 40 45
25 Ala Thr Ile Ser Gly Leu Lys Pro Gly Val Asp Tyr Thr Ile Thr Gly
50 55 60
Tyr Ala Val Thr Leu Glu Arg Asn Gly Arg Glu Leu Met Thr Pro Ile
65 70 75 80
Ser Ile Asn Tyr Arg Thr
30 85
<210> 150
<211> 86

<212> PRT
 <213> Sequência artificial
 <220>
 <223> Descrição de Sequência artificial: polipeptídeo sintético
 5 <400> 150
 Glu Val Val Ala Ala Thr Pro Thr Ser Leu Leu Ile Ser Trp Arg His
 1 5 10 15
 Pro His Phe Pro Thr Arg Tyr Tyr Arg Ile Thr Tyr Gly Glu Thr Gly
 20 25 30
 10 Gly Asn Ser Pro Val Gln Glu Phe Thr Val Pro Leu Gln Pro Pro Thr
 35 40 45
 Ala Thr Ile Ser Gly Leu Lys Pro Gly Val Asp Tyr Thr Ile Thr Gly
 50 55 60
 Tyr Ala Val Thr Glu Glu Arg Asn Gly Arg Thr Leu Arg Thr Pro Ile
 15 65 70 75 80
 Ser Ile Asn Tyr Arg Thr
 85
 <210> 151
 <211> 86
 20 <212> PRT
 <213> Sequência artificial
 <220>
 <223> Descrição de Sequência artificial: polipeptídeo sintético
 <400> 151
 25 Glu Val Val Ala Ala Thr Pro Thr Ser Leu Leu Ile Ser Trp Arg His
 1 5 10 15
 Pro His Phe Pro Thr Arg Tyr Tyr Arg Ile Thr Tyr Gly Glu Thr Gly
 20 25 30
 Gly Asn Ser Pro Val Gln Glu Phe Thr Val Pro Leu Gln Pro Pro Thr
 35 40 45
 30 Ala Thr Ile Ser Gly Leu Lys Pro Gly Val Asp Tyr Thr Ile Thr Gly
 50 55 60

Tyr Ala Val Thr Val Glu Arg Asn Asp Arg Val Leu Phe Thr Pro Ile

65

70

75

80

Ser Ile Asn Tyr Arg Thr

85

5 <210> 152

<211> 86

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

10 <223> Descrição de Sequência artificial: polipeptídeo sintético

<400> 152

Glu Val Val Ala Ala Thr Pro Thr Ser Leu Leu Ile Ser Trp Arg His

1

5

10

15

Pro His Phe Pro Thr Arg Tyr Tyr Arg Ile Thr Tyr Gly Glu Thr Gly

15

20

25

30

Gly Asn Ser Pro Val Gln Glu Phe Thr Val Pro Leu Gln Pro Pro Thr

35

40

45

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

50

55

60

20 Tyr Ala Val Thr Val Glu Arg Asn Gly Arg Glu Leu Met Thr Pro Ile

65

70

75

80

Ser Ile Asn Tyr Arg Thr

85

<210> 153

25 <211> 86

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Descrição de Sequência artificial: polipeptídeo sintético

30 <400> 153

Glu Val Val Ala Ala Thr Pro Thr Ser Leu Leu Ile Ser Trp Arg His

1

5

10

15

Pro His Phe Pro Thr Arg Tyr Tyr Arg Ile Thr Tyr Gly Glu Thr Gly
20 25 30
Gly Asn Ser Pro Val Gln Glu Phe Thr Val Pro Leu Gln Pro Pro Thr
35 40 45
5 Ala Thr Ile Ser Gly Leu Lys Pro Gly Val Asp Tyr Thr Ile Thr Gly
50 55 60
Tyr Ala Val Thr Leu Glu Arg Asn Gly Arg Glu Leu Met Val Pro Ile
65 70 75 80
Ser Ile Asn Tyr Arg Thr
10 85
<210> 154
<211> 86
<212> PRT
<213> Sequência artificial
15 <220>
<223> Descrição de Sequência artificial: polipeptídeo sintético
<400> 154
Glu Val Val Ala Ala Thr Pro Thr Ser Leu Leu Ile Ser Trp Arg His
1 5 10 15
20 Pro His Phe Pro Thr Arg Tyr Tyr Arg Ile Thr Tyr Gly Glu Thr Gly
20 25 30
Gly Asn Ser Pro Val Gln Glu Phe Thr Val Pro Leu Gln Pro Pro Thr
35 40 45
Ala Thr Ile Ser Gly Leu Lys Pro Gly Val Asp Tyr Thr Ile Thr Gly
25 50 55 60
Tyr Ala Val Thr Asp Gly Arg Asn Asp Arg Lys Leu Met Val Pro Ile
65 70 75 80
Ser Ile Asn Tyr Arg Thr
85
30 <210> 155
<211> 86
<212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Descrição de Sequência artificial: polipeptídeo sintético

<400> 155

5 Glu Val Val Ala Ala Thr Pro Thr Ser Leu Leu Ile Ser Trp Arg His
 1 5 10 15
 Pro His Phe Pro Thr Arg Tyr Tyr Arg Ile Thr Tyr Gly Glu Thr Gly
 20 25 30
 Gly Asn Ser Pro Val Gln Glu Phe Thr Val Pro Leu Gln Pro Pro Thr
 10 35 40 45
 Ala Thr Ile Ser Gly Leu Lys Pro Gly Val Asp Tyr Thr Ile Thr Gly
 50 55 60
 Tyr Ala Val Thr Asp Gly Gln Asn Gly Arg Leu Leu Asn Val Pro Ile
 65 70 75 80
 15 Ser Ile Asn Tyr Arg Thr
 85

<210> 156

<211> 87

<212> PRT

20 <213> Sequência artificial

<220>

<223> Descrição de Sequência artificial: polipeptídeo sintético

<400> 156

Glu Val Val Ala Ala Thr Pro Thr Ser Leu Leu Ile Ser Trp Arg His
 25 1 5 10 15
 His Pro His Phe Pro Thr Arg Tyr Tyr Arg Ile Thr Tyr Gly Glu Thr
 20 25 30
 Gly Gly Asn Ser Pro Val Gln Glu Phe Thr Val Pro Leu Gln Pro Pro
 35 40 45
 30 Thr Ala Thr Ile Ser Gly Leu Lys Pro Gly Val Asp Tyr Thr Ile Thr
 50 55 60
 Gly Tyr Ala Val Thr Val His Trp Asn Gly Arg Glu Leu Met Thr Pro

65 70 75 80

Ile Ser Ile Asn Tyr Arg Thr

85

<210> 157

5 <211> 86

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Descrição de Sequência artificial: peptídeo sintético

10 <400> 157

Glu Val Val Ala Ala Thr Pro Thr Ser Leu Leu Ile Ser Trp Arg His

1 5 10 15

Pro His Phe Pro Thr Arg Tyr Tyr Arg Ile Thr Tyr Gly Glu Thr Gly

20 25 30

15 Gly Asn Ser Pro Val Gln Glu Phe Thr Val Pro Leu Gln Pro Pro Thr

35 40 45

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

50 55 60

Tyr Ala Val Thr Glu Glu Trp Asn Gly Arg Val Leu Met Thr Pro Ile

20 65 70 75 80

Ser Ile Asn Tyr Arg Thr

85

<210> 158

<211> 86

25 <212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Descrição de Sequência artificial: peptídeo sintético

<400> 158

30 Glu Val Val Ala Ala Thr Pro Thr Ser Leu Leu Ile Ser Trp Arg His

1 5 10 15

Pro His Phe Pro Thr Arg Tyr Tyr Arg Ile Thr Tyr Gly Glu Thr Gly

20 25 30
 Gly Asn Ser Pro Val Gln Glu Phe Thr Val Pro Leu Gln Pro Pro Thr
 35 40 45
 Ala Thr Ile Ser Gly Leu Lys Pro Gly Val Asp Tyr Thr Ile Thr Gly
 5 50 55 60
 Tyr Ala Val Thr Val Glu Arg Asn Gly His Thr Leu Met Thr Pro Ile
 65 70 75 80
 Ser Ile Asn Tyr Arg Thr
 85
 10 <210> 159
 <211> 86
 <212> PRT
 <213> Sequência artificial
 <220>
 15 <223> Descrição de Sequência artificial: polipeptídeo sintético
 <400> 159
 Glu Val Val Ala Ala Thr Pro Thr Ser Leu Leu Ile Ser Trp Arg His
 1 5 10 15
 Pro His Phe Pro Thr Arg Tyr Tyr Arg Ile Thr Tyr Gly Glu Thr Gly
 20 20 25 30
 Gly Asn Ser Pro Val Gln Glu Phe Thr Val Pro Leu Gln Pro Pro Thr
 35 40 45
 Ala Thr Ile Ser Gly Leu Lys Pro Gly Val Asp Tyr Thr Ile Thr Gly
 50 55 60
 25 Tyr Ala Val Thr Val Glu Glu Asn Gly Arg Gln Leu Met Thr Pro Ile
 65 70 75 80
 Ser Ile Asn Tyr Arg Thr
 85
 <210> 160
 30 <211> 86
 <212> PRT
 <213> Sequência artificial

<220>

<223> Descrição de Sequência artificial: polipeptídeo sintético

<400> 160

Glu Val Val Ala Ala Thr Pro Thr Ser Leu Leu Ile Ser Trp Arg His

5

1

5

10

15

Pro His Phe Pro Thr Arg Tyr Tyr Arg Ile Thr Tyr Gly Glu Thr Gly

20

25

30

Gly Asn Ser Pro Val Gln Glu Phe Thr Val Pro Leu Gln Pro Pro Thr

35

40

45

10

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

50

55

60

Tyr Ala Val Thr Leu Glu Arg Asn Gly Gln Val Leu Phe Thr Pro Ile

65

70

75

80

Ser Ile Asn Tyr Arg Thr

15

85

<210> 161

<211> 86

<212> PRT

<213> Sequência artificial

20

<220>

<223> Descrição de Sequência artificial: polipeptídeo sintético

<400> 161

Glu Val Val Ala Ala Thr Pro Thr Ser Leu Leu Ile Ser Trp Arg His

1

5

10

15

25

Pro His Phe Pro Thr Arg Tyr Tyr Arg Ile Thr Tyr Gly Glu Thr Gly

20

25

30

Gly Asn Ser Pro Val Gln Glu Phe Thr Val Pro Leu Gln Pro Pro Thr

35

40

45

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

30

50

55

60

Tyr Ala Val Thr Val Glu Arg Asn Gly Gln Val Leu Tyr Thr Pro Ile

65

70

75

80

Ser Ile Asn Tyr Arg Thr

85

<210> 162

<211> 86

5 <212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Descrição de Sequência artificial: polipeptídeo sintético

<400> 162

10 Glu Val Val Ala Ala Thr Pro Thr Ser Leu Leu Ile Ser Trp Arg His

1 5 10 15

Pro His Phe Pro Thr Arg Tyr Tyr Arg Ile Thr Tyr Gly Glu Thr Gly

20 25 30

Gly Asn Ser Pro Val Gln Glu Phe Thr Val Pro Leu Gln Pro Pro Thr

15 35 40 45

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

50 55 60

Tyr Ala Val Thr Trp Gly Tyr Lys Asp His Glu Leu Leu Ile Pro Ile

65 70 75 80

20 Ser Ile Asn Tyr Arg Thr

85

<210> 163

<211> 86

<212> PRT

25 <213> Sequência artificial

<220>

<223> Descrição de Sequência artificial: polipeptídeo sintético

<400> 163

Glu Val Val Ala Ala Thr Pro Thr Ser Leu Leu Ile Ser Trp Arg His

30 1 5 10 15

Pro His Phe Pro Thr Arg Tyr Tyr Arg Ile Thr Tyr Gly Glu Thr Gly

20 25 30

Gly Asn Ser Pro Val Gln Glu Phe Thr Val Pro Leu Gln Pro Pro Thr
 35 40 45
 Ala Thr Ile Ser Gly Leu Lys Pro Gly Val Asp Tyr Thr Ile Thr Gly
 50 55 60
 5 Tyr Ala Val Thr Leu Gly Arg Asn Asp Arg Glu Leu Leu Thr Pro Ile
 65 70 75 80
 Ser Ile Asn Tyr Arg Thr
 85
 <210> 164
 10 <211> 86
 <212> PRT
 <213> Sequência artificial
 <220>
 <223> Descrição de Sequência artificial: polipeptídeo sintético
 15 <400> 164
 Glu Val Val Ala Ala Thr Pro Thr Ser Leu Leu Ile Ser Trp Arg His
 1 5 10 15
 Pro His Phe Pro Thr Arg Tyr Tyr Arg Ile Thr Tyr Gly Glu Thr Gly
 20 20 25 30
 20 Gly Asn Ser Pro Val Gln Glu Phe Thr Val Pro Leu Gln Pro Pro Thr
 35 40 45
 Ala Thr Ile Ser Gly Leu Lys Pro Gly Val Asp Tyr Thr Ile Thr Gly
 50 55 60
 Tyr Ala Val Thr Asp Gly Pro Asn Asp Arg Leu Leu Asn Ile Pro Ile
 25 65 70 75 80
 Ser Ile Asn Tyr Arg Thr
 85
 <210> 165
 <211> 86
 30 <212> PRT
 <213> Sequência artificial
 <220>

<223> Descrição de Sequência artificial: polipeptídeo sintético

<400> 165

Glu Val Val Ala Ala Thr Pro Thr Ser Leu Leu Ile Ser Trp Arg His

1 5 10 15

5 Pro His Phe Pro Thr Arg Tyr Tyr Arg Ile Thr Tyr Gly Glu Thr Gly

20 25 30

Gly Asn Ser Pro Val Gln Glu Phe Thr Val Pro Leu Gln Pro Pro Thr

35 40 45

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

10 50 55 60

Tyr Ala Val Thr Phe Ala Arg Asp Gly His Glu Ile Leu Thr Pro Ile

65 70 75 80

Ser Ile Asn Tyr Arg Thr

85

15 <210> 166

<211> 86

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

20 <223> Descrição de Sequência artificial: polipeptídeo sintético

<400> 166

Glu Val Val Ala Ala Thr Pro Thr Ser Leu Leu Ile Ser Trp Arg His

1 5 10 15

Pro His Phe Pro Thr Arg Tyr Tyr Arg Ile Thr Tyr Gly Glu Thr Gly

25 20 25 30

Gly Asn Ser Pro Val Gln Glu Phe Thr Val Pro Leu Gln Pro Pro Thr

35 40 45

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

50 55 60

30 Tyr Ala Val Thr Leu Glu Gln Asn Gly Arg Glu Leu Met Thr Pro Ile

65 70 75 80

Ser Ile Asn Tyr Arg Thr

85

<210> 167

<211> 86

<212> PRT

5 <213> Sequência artificial

<220>

<223> Descrição de Sequência artificial: polipeptídeo sintético

<400> 167

Glu Val Val Ala Ala Thr Pro Thr Ser Leu Leu Ile Ser Trp Arg His

10 1 5 10 15

Pro His Phe Pro Thr Arg Tyr Tyr Arg Ile Thr Tyr Gly Glu Thr Gly

20 25 30

Gly Asn Ser Pro Val Gln Glu Phe Thr Val Pro Leu Gln Pro Pro Thr

35 40 45

15 Ala Thr Ile Ser Gly Leu Lys Pro Gly Val Asp Tyr Thr Ile Thr Gly

50 55 60

Tyr Ala Val Thr Val Glu Glu Asn Gly Arg Val Leu Asn Thr Pro Ile

65 70 75 80

Ser Ile Asn Tyr Arg Thr

20 85

<210> 168

<211> 86

<212> PRT

<213> Sequência artificial

25 <220>

<223> Descrição de Sequência artificial: polipeptídeo sintético

<400> 168

Glu Val Val Ala Ala Thr Pro Thr Ser Leu Leu Ile Ser Trp Arg His

1 5 10 15

30 Pro His Phe Pro Thr Arg Tyr Tyr Arg Ile Thr Tyr Gly Glu Thr Gly

20 25 30

Gly Asn Ser Pro Val Gln Glu Phe Thr Val Pro Leu Gln Pro Pro Thr

35 40 45
 Ala Thr Ile Ser Gly Leu Lys Pro Gly Val Asp Tyr Thr Ile Thr Gly
 50 55 60
 Tyr Ala Val Thr Leu Glu Pro Asn Gly Arg Tyr Leu Met Val Pro Ile
 5 65 70 75 80
 Ser Ile Asn Tyr Arg Thr
 85
 <210> 169
 <211> 86
 10 <212> PRT
 <213> Sequência artificial
 <220>
 <223> Descrição de Sequência artificial: polipeptídeo sintético
 <400> 169
 15 Glu Val Val Ala Ala Thr Pro Thr Ser Leu Leu Ile Ser Trp Arg His
 1 5 10 15
 Pro His Phe Pro Thr Arg Tyr Tyr Arg Ile Thr Tyr Gly Glu Thr Gly
 20 20 25 30
 Gly Asn Ser Pro Val Gln Glu Phe Thr Val Pro Leu Gln Pro Pro Thr
 20 35 40 45
 Ala Thr Ile Ser Gly Leu Lys Pro Gly Val Asp Tyr Thr Ile Thr Gly
 50 55 60
 Tyr Ala Val Thr Glu Gly Arg Asn Gly Arg Glu Leu Phe Ile Pro Ile
 65 70 75 80
 25 Ser Ile Asn Tyr Arg Thr
 85
 <210> 170
 <211> 94
 <212> PRT
 30 <213> Sequência artificial
 <220>
 <223> Descrição de Sequência artificial: polipeptídeo sintético

<400> 170

Val Ser Asp Val Pro Arg Asp Leu Glu Val Val Ala Ala Thr Pro Thr

1 5 10 15

Ser Leu Leu Ile Ser Trp Arg His Pro His Phe Pro Thr Arg Tyr Tyr

5 20 25 30

Arg Ile Thr Tyr Gly Glu Thr Gly Gly Asn Ser Pro Val Gln Glu Phe

35 40 45

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

50 55 60

10 Gly Val Asp Tyr Thr Ile Thr Gly Tyr Ala Val Thr Trp Glu Arg Asn

65 70 75 80

Gly Arg Glu Leu Phe Thr Pro Ile Ser Ile Asn Tyr Arg Thr

85 90

<210> 171

15 <211> 94

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Descrição de Sequência artificial: polipeptídeo sintético

20 <400> 171

Val Ser Asp Val Pro Arg Asp Leu Glu Val Val Ala Ala Thr Pro Thr

1 5 10 15

Ser Leu Leu Ile Ser Trp Arg His Pro His Phe Pro Thr Arg Tyr Tyr

20 25 30

25 Arg Ile Thr Tyr Gly Glu Thr Gly Gly Asn Ser Pro Val Gln Glu Phe

35 40 45

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

50 55 60

Gly Val Asp Tyr Thr Ile Thr Gly Tyr Ala Val Thr Lys Glu Arg Asn

30 65 70 75 80

Gly Arg Glu Leu Phe Thr Pro Ile Ser Ile Asn Tyr Arg Thr

85 90

<210> 172

<211> 94

<212> PRT

<213> Sequência artificial

5 <220>

<223> Descrição de Sequência artificial: polipeptídeo sintético

<400> 172

Val Ser Asp Val Pro Arg Asp Leu Glu Val Val Ala Ala Thr Pro Thr

1 5 10 15

10 Ser Leu Leu Ile Ser Trp Arg His Pro His Phe Pro Thr His Tyr Tyr

20 25 30

Arg Ile Thr Tyr Gly Glu Thr Gly Gly Asn Ser Pro Val Gln Glu Phe

35 40 45

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

15 50 55 60

Gly Val Asp Tyr Thr Ile Thr Gly Tyr Ala Val Thr Thr Glu Arg Thr

65 70 75 80

Gly Arg Glu Leu Phe Thr Pro Ile Ser Ile Asn Tyr Arg Thr

85 90

20 <210> 173

<211> 94

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

25 <223> Descrição de Sequência artificial: polipeptídeo sintético

<400> 173

Val Ser Asp Val Pro Arg Asp Leu Glu Val Val Ala Ala Thr Pro Thr

1 5 10 15

Ser Leu Leu Ile Ser Trp Arg His Pro His Phe Pro Thr His Tyr Tyr

30 20 25 30

Arg Ile Thr Tyr Gly Glu Thr Gly Gly Asn Ser Pro Val Gln Glu Phe

35 40 45

Thr Val Pro Leu Gln Pro Pro Ala Ala Thr Ile Ser Gly Leu Lys Pro
 50 55 60
 Gly Val Asp Tyr Thr Ile Thr Gly Tyr Ala Val Thr Lys Glu Arg Ser
 65 70 75 80
 5 Gly Arg Glu Leu Phe Thr Pro Ile Ser Ile Asn Tyr Arg Thr
 85 90

<210> 174

<211> 94

<212> PRT

10 <213> Sequência artificial

<220>

<223> Descrição de Sequência artificial: polipeptídeo sintético

<400> 174

Val Ser Asp Val Pro Arg Asp Leu Glu Val Val Ala Ala Thr Pro Thr
 15 1 5 10 15
 Ser Leu Leu Ile Ser Trp Arg His Pro His Phe Pro Thr His Tyr Tyr
 20 25 30
 Arg Ile Thr Tyr Gly Glu Thr Gly Gly Asn Ser Pro Val Gln Glu Phe
 35 40 45

20 Thr Val Pro Leu Gln Pro Pro Ala Ala Thr Ile Ser Gly Leu Lys Pro
 50 55 60
 Gly Val Asp Tyr Thr Ile Thr Gly Tyr Ala Val Thr Leu Glu Arg Asp
 65 70 75 80
 Gly Arg Glu Leu Phe Thr Pro Ile Ser Ile Asn Tyr Arg Thr
 25 85 90

<210> 175

<211> 95

<212> PRT

<213> Sequência artificial

30 <220>

<223> Descrição de Sequência artificial: polipeptídeo sintético

<400> 175

Val Ser Asp Val Pro Arg Asp Leu Glu Val Val Ala Ala Thr Pro Thr
 1 5 10 15
 Ser Leu Leu Ile Ser Trp Arg His Pro His Phe Pro Thr Arg Tyr Tyr
 20 25 30
 5 Arg Ile Thr Tyr Gly Glu Thr Gly Gly Asn Ser Pro Val Gln Glu Phe
 35 40 45
 Thr Val Pro Leu Gln Pro Pro Leu Ala Thr Ile Ser Gly Leu Lys Pro
 50 55 60
 Gly Val Asp Tyr Thr Ile Thr Gly Val Tyr Ala Val Thr Lys Glu Arg
 10 65 70 75 80
 Asn Gly Arg Glu Leu Phe Thr Pro Ile Ser Ile Asn Tyr Arg Thr
 85 90 95
 <210> 176
 <211> 94
 15 <212> PRT
 <213> Sequência artificial
 <220>
 <223> Descrição de Sequência artificial: polipeptídeo sintético
 <400> 176
 20 Val Ser Asp Val Pro Arg Asp Leu Glu Val Val Ala Ala Thr Pro Thr
 1 5 10 15
 Ser Leu Leu Ile Ser Trp Arg His Pro His Phe Pro Thr Arg Tyr Tyr
 20 25 30
 Arg Ile Thr Tyr Gly Glu Thr Gly Gly Asn Ser Pro Val Gln Glu Phe
 25 35 40 45
 Thr Val Pro Leu Gln Pro Thr Thr Ala Thr Ile Ser Gly Leu Lys Pro
 50 55 60
 Gly Val Asp Tyr Thr Ile Thr Gly Tyr Ala Val Thr Trp Glu Arg Asn
 65 70 75 80
 30 Gly Arg Glu Leu Phe Thr Pro Ile Ser Ile Asn Tyr Arg Thr
 85 90
 <210> 177

<211> 94

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

5 <223> Descrição de Sequência artificial: polipeptídeo sintético

<400> 177

Val Ser Asp Val Pro Arg Asp Leu Glu Val Val Ala Ala Thr Pro Thr

1 5 10 15

Ser Leu Leu Ile Ser Trp Arg His Pro His Phe Pro Thr Arg Tyr Tyr

10 20 25 30

Arg Ile Thr Tyr Gly Glu Thr Gly Gly Asn Ser Pro Val Gln Glu Phe

35 40 45

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

50 55 60

15 Gly Val Asp Tyr Thr Ile Thr Gly Tyr Ala Val Thr Leu Glu Arg Asn

65 70 75 80

Asp Arg Glu Leu Phe Thr Pro Ile Ser Ile Asn Tyr Arg Thr

85 90

<210> 178

20 <211> 95

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Descrição de Sequência artificial: polipeptídeo sintético

25 <400> 178

Met Gly Glu Val Val Ala Ala Thr Pro Thr Ser Leu Leu Ile Ser Trp

1 5 10 15

Arg His Pro His Phe Pro Thr Arg Tyr Tyr Arg Ile Thr Tyr Gly Glu

20 25 30

30 Thr Gly Gly Asn Ser Pro Val Gln Glu Phe Thr Val Pro Leu Gln Pro

35 40 45

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

	50	55	60
	Thr Val Tyr Ala Val Thr Asp Gly Arg Asn Gly Arg Leu Leu Ser Ile		
	65	70	75 80
	Pro Ile Ser Ile Asn Tyr Arg Thr Glu Ile Asp Lys Pro Ser Gln		
5	85	90	95
	<210> 179		
	<211> 95		
	<212> PRT		
	<213> Sequência artificial		
10	<220>		
	<223> Descrição de Sequência artificial: polipeptídeo sintético		
	<400> 179		
	Met Gly Glu Val Val Ala Ala Thr Pro Thr Ser Leu Leu Ile Ser Trp		
	1 5 10 15		
15	Arg His Pro His Phe Pro Thr Arg Tyr Tyr Arg Ile Thr Tyr Gly Glu		
	20 25 30		
	Thr Gly Gly Asn Ser Pro Val Gln Glu Phe Thr Val Pro Leu Gln Pro		
	35 40 45		
	Pro Thr Ala Thr Ile Ser Gly Leu Lys Pro Gly Val Asp Tyr Thr Ile		
20	50 55 60		
	Thr Val Tyr Ala Val Thr Asp Gly Arg Asn Gly Arg Leu Leu Ser Ile		
	65 70 75 80		
	Pro Ile Ser Ile Asn Tyr Arg Thr Glu Ile Asp Lys Pro Cys Gln		
	85 90 95		
25	<210> 180		
	<211> 102		
	<212> PRT		
	<213> Sequência artificial		
	<220>		
30	<223> Descrição de Sequência artificial: polipeptídeo sintético		
	<400> 180		
	Met Val Ser Asp Val Pro Arg Asp Leu Glu Val Val Ala Ala Thr Pro		

1 5 10 15
 Thr Ser Leu Leu Ile Ser Trp Arg His Pro His Phe Pro Thr Arg Tyr
 20 25 30
 Tyr Arg Ile Thr Tyr Gly Glu Thr Gly Gly Asn Ser Pro Val Gln Glu
 5 35 40 45
 Phe Thr Val Pro Leu Gln Pro Pro Thr Ala Thr Ile Ser Gly Leu Lys
 50 55 60
 Pro Gly Val Asp Tyr Thr Ile Thr Val Tyr Ala Val Thr Asp Gly Arg
 65 70 75 80
 10 Asn Gly Arg Leu Leu Ser Ile Pro Ile Ser Ile Asn Tyr Arg Thr Glu
 85 90 95
 Ile Asp Lys Pro Ser Gln
 100
 <210> 181
 15 <211> 88
 <212> PRT
 <213> Sequência artificial
 <220>
 <223> Descrição de Sequência artificial: polipeptídeo sintético
 20 <400> 181
 Met Gly Glu Val Val Ala Ala Thr Pro Thr Ser Leu Leu Ile Ser Trp
 1 5 10 15
 Arg His Pro His Phe Pro Thr Arg Tyr Tyr Arg Ile Thr Tyr Gly Glu
 20 25 30
 25 Thr Gly Gly Asn Ser Pro Val Gln Glu Phe Thr Val Pro Leu Gln Pro
 35 40 45
 Pro Thr Ala Thr Ile Ser Gly Leu Lys Pro Gly Val Asp Tyr Thr Ile
 50 55 60
 Thr Val Tyr Ala Val Thr Asp Gly Trp Asn Gly Arg Leu Leu Ser Ile
 30 65 70 75 80
 Pro Ile Ser Ile Asn Tyr Arg Thr
 85

<210> 182

<211> 88

<212> PRT

<213> Sequência artificial

5 <220>

<223> Descrição de Sequência artificial: polipeptídeo sintético

<400> 182

Met Gly Glu Val Val Ala Ala Thr Pro Thr Ser Leu Leu Ile Ser Trp

1 5 10 15

10 Arg His Pro His Phe Pro Thr Arg Tyr Tyr Arg Ile Thr Tyr Gly Glu

20 25 30

Thr Gly Gly Asn Ser Pro Val Gln Glu Phe Thr Val Pro Leu Gln Pro

35 40 45

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

15 50 55 60

Thr Val Tyr Ala Val Thr Glu Gly Pro Asn Glu Arg Ser Leu Phe Ile

65 70 75 80

Pro Ile Ser Ile Asn Tyr Arg Thr

85

20 <210> 183

<211> 95

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

25 <223> Descrição de Sequência artificial: polipeptídeo sintético

<400> 183

Met Val Ser Asp Val Pro Arg Asp Leu Glu Val Val Ala Ala Thr Pro

1 5 10 15

Thr Ser Leu Leu Ile Ser Trp Arg His Pro His Phe Pro Thr Arg Tyr

30 20 25 30

Tyr Arg Ile Thr Tyr Gly Glu Thr Gly Gly Asn Ser Pro Val Gln Glu

35 40 45

Phe Thr Val Pro Leu Gln Pro Pro Thr Ala Thr Ile Ser Gly Leu Lys
 50 55 60
 Pro Gly Val Asp Tyr Thr Ile Thr Val Tyr Ala Val Thr Glu Gly Pro
 65 70 75 80
 5 Asn Glu Arg Ser Leu Phe Ile Pro Ile Ser Ile Asn Tyr Arg Thr
 85 90 95
 <210> 184
 <211> 90
 <212> PRT
 10 <213> Sequência artificial
 <220>
 <223> Descrição de Sequência artificial: polipeptídeo sintético
 <400> 184
 Val Ser Asp Val Pro Arg Asp Leu Glu Val Val Ala Ala Thr Pro Thr
 15 1 5 10 15
 Ser Leu Leu Ile Ser Trp Ser Ala Arg Leu Lys Val Ala Arg Tyr Tyr
 20 25 30
 Arg Ile Thr Tyr Gly Glu Thr Gly Gly Asn Ser Pro Val Gln Glu Phe
 35 40 45
 20 Thr Val Pro Lys Asn Val Tyr Thr Ala Thr Ile Ser Gly Leu Lys Pro
 50 55 60
 Gly Val Asp Tyr Thr Ile Thr Val Tyr Ala Val Thr Arg Phe Arg Asp
 65 70 75 80
 Tyr Gln Pro Ile Ser Ile Asn Tyr Arg Thr
 25 85 90
 <210> 185
 <211> 90
 <212> PRT
 <213> Sequência artificial
 30 <220>
 <223> Descrição de Sequência artificial: polipeptídeo sintético
 <400> 185

Val Ser Asp Val Pro Arg Asp Leu Glu Val Val Ala Ala Thr Pro Thr
 1 5 10 15
 Ser Leu Leu Ile Ser Trp Ser Ala Arg Leu Lys Val Ala Arg Tyr Tyr
 20 25 30
 5 Arg Ile Thr Tyr Gly Glu Thr Gly Gly Asn Ser Pro Val Gln Glu Phe
 35 40 45
 Thr Val Pro Lys Asn Val Tyr Thr Ala Thr Ile Ser Gly Leu Lys Pro
 50 55 60
 Gly Val Asp Tyr Thr Ile Thr Val Tyr Ala Val Thr Arg Ile Arg Asp
 10 65 70 75 80
 Tyr Gly Pro Ile Ser Ile Asn Tyr Arg Thr
 85 90
 <210> 186
 <211> 90
 15 <212> PRT
 <213> Sequência artificial
 <220>
 <223> Descrição de Sequência artificial: polipeptídeo sintético
 <400> 186
 20 Val Ser Asp Val Pro Arg Asp Leu Glu Val Val Ala Ala Thr Pro Thr
 1 5 10 15
 Ser Leu Leu Ile Ser Trp Ser Ala Arg Leu Lys Val Ala Arg Tyr Tyr
 20 25 30
 Arg Ile Thr Tyr Gly Glu Thr Gly Gly Asn Ser Pro Val Gln Glu Phe
 35 40 45
 25 Thr Val Pro Lys Asn Val Tyr Thr Ala Thr Ile Ser Gly Leu Lys Pro
 50 55 60
 Gly Val Asp Tyr Thr Ile Thr Val Tyr Ala Val Thr Ala Tyr Arg Asp
 65 70 75 80
 30 Tyr Gln Pro Ile Ser Ile Asn Tyr Arg Thr
 85 90
 <210> 187

<211> 90

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

- 5 <223> Descrição de Sequência artificial: polipeptídeo sintético
<400> 187

Val Ser Asp Val Pro Arg Asp Leu Glu Val Val Ala Ala Thr Pro Thr
1 5 10 15

Ser Leu Leu Ile Ser Trp Ser Ala Arg Leu Lys Val Ala Arg Tyr Tyr
10 20 25 30

Arg Ile Thr Tyr Gly Glu Thr Gly Gly Asn Ser Pro Val Gln Glu Phe
35 40 45

Thr Val Pro Lys Asn Val Tyr Thr Ala Thr Ile Ser Gly Leu Lys Pro
50 55 60

- 15 Gly Val Asp Tyr Thr Ile Thr Val Tyr Ala Val Thr Arg Glu Arg Asp
65 70 75 80

Tyr Arg Pro Ile Ser Ile Asn Tyr Arg Thr
85 90

<210> 188

- 20 <211> 90

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Descrição de Sequência artificial: polipeptídeo sintético

- 25 <400> 188

Val Ser Asp Val Pro Arg Asp Leu Glu Val Val Ala Ala Thr Pro Thr
1 5 10 15

Ser Leu Leu Ile Ser Trp Ser Ala Arg Leu Lys Val Ala Arg Tyr Tyr
20 25 30

- 30 Arg Ile Thr Tyr Gly Glu Thr Gly Gly Asn Ser Pro Val Gln Glu Phe
35 40 45

Thr Val Pro Lys Asn Val Tyr Thr Ala Thr Ile Ser Gly Leu Lys Pro

50 55 60
 Gly Val Asp Tyr Thr Ile Thr Val Tyr Ala Val Thr Ala Val Arg Asp
 65 70 75 80
 Tyr Arg Pro Ile Ser Ile Asn Tyr Arg Thr
 5 85 90
 <210> 189
 <211> 90
 <212> PRT
 <213> Sequência artificial
 10 <220>
 <223> Descrição de Sequência artificial: polipeptídeo sintético
 <400> 189
 Val Ser Asp Val Pro Arg Asp Leu Glu Val Val Ala Ala Thr Pro Thr
 1 5 10 15
 15 Ser Leu Leu Ile Ser Trp Ser Ala Arg Leu Lys Val Ala Arg Tyr Tyr
 20 25 30
 Arg Ile Thr Tyr Gly Glu Thr Gly Gly Asn Ser Pro Val Gln Glu Phe
 35 40 45
 Thr Val Pro Lys Asn Val Tyr Thr Ala Thr Ile Ser Gly Leu Lys Pro
 20 50 55 60
 Gly Val Asp Tyr Thr Ile Thr Val Tyr Ala Val Thr Glu Leu Arg Asn
 65 70 75 80
 Tyr Gly Pro Ile Ser Ile Asn Tyr Arg Thr
 85 90
 25 <210> 190
 <211> 90
 <212> PRT
 <213> Sequência artificial
 <220>
 30 <223> Descrição de Sequência artificial: polipeptídeo sintético
 <400> 190
 Val Ser Asp Val Pro Arg Asp Leu Glu Val Val Ala Ala Thr Pro Thr

1 5 10 15
 Ser Leu Leu Ile Ser Trp Ser Ala Arg Leu Lys Val Ala Arg Tyr Tyr
 20 25 30
 Arg Ile Thr Tyr Gly Glu Thr Gly Gly Asn Ser Pro Val Gln Glu Phe
 5 35 40 45
 Thr Val Pro Lys Asn Val Tyr Thr Ala Thr Ile Ser Gly Leu Lys Pro
 50 55 60
 Gly Val Asp Tyr Thr Ile Thr Val Tyr Ala Val Thr Ser Leu Arg Asp
 65 70 75 80
 10 Tyr Ala Pro Ile Ser Ile Asn Tyr Arg Thr
 85 90
 <210> 191
 <211> 90
 <212> PRT
 15 <213> Sequência artificial
 <220>
 <223> Descrição de Sequência artificial: polipeptídeo sintético
 <400> 191
 Val Ser Asp Val Pro Arg Asp Leu Glu Val Val Ala Ala Thr Pro Thr
 20 1 5 10 15
 Ser Leu Leu Ile Ser Trp Ser Ala Arg Leu Lys Val Ala Arg Tyr Tyr
 20 25 30
 Arg Ile Thr Tyr Gly Glu Thr Gly Gly Asn Ser Pro Val Gln Glu Phe
 35 40 45
 25 Thr Val Pro Lys Asn Val Tyr Thr Ala Thr Ile Ser Gly Leu Lys Pro
 50 55 60
 Gly Val Asp Tyr Thr Ile Thr Val Tyr Ala Val Thr Gln Leu Arg Asp
 65 70 75 80
 Tyr Ser Pro Ile Ser Ile Asn Tyr Arg Thr
 30 85 90
 <210> 192
 <211> 90

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Descrição de Sequência artificial: polipeptídeo sintético

5 <400> 192

Val Ser Asp Val Pro Arg Asp Leu Glu Val Val Ala Ala Thr Pro Thr

1 5 10 15

Ser Leu Leu Ile Ser Trp Ser Ala Arg Leu Lys Val Ala Arg Tyr Tyr

20 25 30

10 Arg Ile Thr Tyr Gly Glu Thr Gly Gly Asn Ser Pro Val Gln Glu Phe

35 40 45

Thr Val Pro Lys Asn Val Tyr Thr Ala Thr Ile Ser Gly Leu Lys Pro

50 55 60

Gly Val Asp Tyr Thr Ile Thr Val Tyr Ala Val Thr Asn Leu Arg Asp

15 65 70 75 80

Tyr Gly Pro Ile Ser Ile Asn Tyr Arg Thr

85 90

<210> 193

<211> 90

20 <212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Descrição de Sequência artificial: polipeptídeo sintético

<400> 193

25 Val Ser Asp Val Pro Arg Asp Leu Glu Val Val Ala Ala Thr Pro Thr

1 5 10 15

Ser Leu Leu Ile Ser Trp Ser Ala Arg Leu Lys Val Ala Arg Tyr Tyr

20 25 30

Arg Ile Thr Tyr Gly Glu Thr Gly Gly Asn Ser Pro Val Gln Glu Phe

30 35 40 45

Thr Val Pro Lys Asn Val Tyr Thr Ala Thr Ile Ser Gly Leu Lys Pro

50 55 60

Gly Val Asp Tyr Thr Ile Thr Val Tyr Ala Val Thr Glu Arg Arg Asp
 65 70 75 80
 Tyr Arg Pro Ile Ser Ile Asn Tyr Arg Thr
 85 90

5 <210> 194
 <211> 90
 <212> PRT
 <213> Sequência artificial
 <220>

10 <223> Descrição de Sequência artificial: polipeptídeo sintético
 <400> 194
 Val Ser Asp Val Pro Arg Asp Leu Glu Val Val Ala Ala Thr Pro Thr
 1 5 10 15
 Ser Leu Leu Ile Ser Trp Ser Ala Arg Leu Lys Val Ala Arg Tyr Tyr
 15 20 25 30
 Arg Ile Thr Tyr Gly Glu Thr Gly Gly Asn Ser Pro Val Gln Glu Phe
 35 40 45
 Thr Val Pro Lys Asn Val Tyr Thr Ala Thr Ile Ser Gly Leu Lys Pro
 50 55 60

20 Gly Val Asp Tyr Thr Ile Thr Val Tyr Ala Val Thr Leu Val Arg Asn
 65 70 75 80
 Tyr Gly Pro Ile Ser Ile Asn Tyr Arg Thr
 85 90

<210> 195

25 <211> 90
 <212> PRT
 <213> Sequência artificial
 <220>

<223> Descrição de Sequência artificial: polipeptídeo sintético

30 <400> 195
 Val Ser Asp Val Pro Arg Asp Leu Glu Val Val Ala Ala Thr Pro Thr
 1 5 10 15

Ser Leu Leu Ile Ser Trp Ser Ala Arg Leu Lys Val Ala Arg Tyr Tyr
20 25 30
Arg Ile Thr Tyr Gly Glu Thr Gly Gly Asn Ser Pro Val Gln Glu Phe
35 40 45
5 Thr Val Pro Lys Asn Val Tyr Thr Ala Thr Ile Ser Gly Leu Lys Pro
50 55 60
Gly Val Asp Tyr Thr Ile Thr Val Tyr Ala Val Thr Thr Ile Arg Asp
65 70 75 80
Tyr Arg Pro Ile Ser Ile Asn Tyr Arg Thr
10 85 90
<210> 196
<211> 90
<212> PRT
<213> Sequência artificial
15 <220>
<223> Descrição de Sequência artificial: polipeptídeo sintético
<400> 196
Val Ser Asp Val Pro Arg Asp Leu Glu Val Val Ala Ala Thr Pro Thr
1 5 10 15
20 Ser Leu Leu Ile Ser Trp Ser Ala Arg Leu Lys Val Ala Arg Tyr Tyr
20 25 30
Arg Ile Thr Tyr Gly Glu Thr Gly Gly Asn Ser Pro Val Gln Glu Phe
35 40 45
Thr Val Pro Lys Asn Val Tyr Thr Ala Thr Ile Ser Gly Leu Lys Pro
25 50 55 60
Gly Val Asp Tyr Thr Ile Thr Val Tyr Ala Val Thr Leu Leu Arg Asp
65 70 75 80
Tyr Gly Pro Ile Ser Ile Asn Tyr Arg Thr
85 90
30 <210> 197
<211> 90
<212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Descrição de Sequência artificial: polipeptídeo sintético

<400> 197

5 Val Ser Asp Val Pro Arg Asp Leu Glu Val Val Ala Ala Thr Pro Thr
 1 5 10 15
 Ser Leu Leu Ile Ser Trp Ser Ala Arg Leu Lys Val Ala Arg Tyr Tyr
 20 25 30
 Arg Ile Thr Tyr Gly Glu Thr Gly Gly Asn Ser Pro Val Gln Glu Phe
 10 35 40 45
 Thr Val Pro Lys Asn Val Tyr Thr Ala Thr Ile Ser Gly Leu Lys Pro
 50 55 60
 Gly Val Asp Tyr Thr Ile Thr Val Tyr Ala Val Thr Leu Thr Arg Asp
 65 70 75 80
 15 Tyr Lys Pro Ile Ser Ile Asn Tyr Arg Thr
 85 90

<210> 198

<211> 90

<212> PRT

20 <213> Sequência artificial

<220>

<223> Descrição de Sequência artificial: polipeptídeo sintético

<400> 198

25 Val Ser Asp Val Pro Arg Asp Leu Glu Val Val Ala Ala Thr Pro Thr
 1 5 10 15
 Ser Leu Leu Ile Ser Trp Ser Ala Arg Leu Lys Val Ala Arg Tyr Tyr
 20 25 30
 Arg Ile Thr Tyr Gly Glu Thr Gly Gly Asn Ser Pro Val Gln Glu Phe
 35 40 45
 30 Thr Val Pro Lys Asn Val Tyr Thr Ala Thr Ile Ser Gly Leu Lys Pro
 50 55 60
 Gly Val Asp Tyr Thr Ile Thr Val Tyr Ala Val Thr Val Val Arg Asp

65 70 75 80
Tyr Arg Pro Ile Ser Ile Asn Tyr Arg Thr
85 90

5 <210> 199
<211> 90
<212> PRT
<213> Sequência artificial
<220>
<223> Descrição de Sequência artificial: polipeptídeo sintético

10 <400> 199
Val Ser Asp Val Pro Arg Asp Leu Glu Val Val Ala Ala Thr Pro Thr
1 5 10 15
Ser Leu Leu Ile Ser Trp Ser Ala Arg Leu Lys Val Ala Arg Tyr Tyr
20 25 30
15 Arg Ile Thr Tyr Gly Glu Thr Gly Gly Asn Ser Pro Val Gln Glu Phe
35 40 45
Thr Val Pro Lys Asn Val Tyr Thr Ala Thr Ile Ser Gly Leu Lys Pro
50 55 60
Gly Val Asp Tyr Thr Ile Thr Val Tyr Ala Val Thr Ser Tyr Arg Asp
20 65 70 75 80
Tyr Trp Pro Ile Ser Ile Asn Tyr Arg Thr
85 90

25 <210> 200
<211> 90
<212> PRT
<213> Sequência artificial
<220>
<223> Descrição de Sequência artificial: polipeptídeo sintético
<400> 200

30 Val Ser Asp Val Pro Arg Asp Leu Glu Val Val Ala Ala Thr Pro Thr
1 5 10 15
Ser Leu Leu Ile Ser Trp Ser Ala Arg Leu Lys Val Ala Arg Tyr Tyr

20 25 30
 Arg Ile Thr Tyr Gly Glu Thr Gly Gly Asn Ser Pro Val Gln Glu Phe
 35 40 45
 Thr Val Pro Lys Asn Val Tyr Thr Ala Thr Ile Ser Gly Leu Lys Pro
 5 50 55 60
 Gly Val Asp Tyr Thr Ile Thr Val Tyr Ala Val Thr Met Ser Arg Asp
 65 70 75 80
 Tyr Gly Pro Ile Ser Ile Asn Tyr Arg Thr
 85 90
 10 <210> 201
 <211> 90
 <212> PRT
 <213> Sequência artificial
 <220>
 15 <223> Descrição de Sequência artificial: polipeptídeo sintético
 <400> 201
 Val Ser Asp Val Pro Arg Asp Leu Glu Val Val Ala Ala Thr Pro Thr
 1 5 10 15
 Ser Leu Leu Ile Ser Trp Ser Ala Arg Leu Lys Val Ala Arg Tyr Tyr
 20 20 25 30
 Arg Ile Thr Tyr Gly Glu Thr Gly Gly Asn Ser Pro Val Gln Glu Phe
 35 40 45
 Thr Val Pro Lys Asn Val Tyr Thr Ala Thr Ile Ser Gly Leu Lys Pro
 50 55 60
 25 Gly Val Asp Tyr Thr Ile Thr Val Tyr Ala Val Thr Ser Leu Arg Asp
 65 70 75 80
 Tyr Gly Pro Ile Ser Ile Asn Tyr Arg Thr
 85 90
 <210> 202
 30 <211> 90
 <212> PRT
 <213> Sequência artificial

<220>

<223> Descrição de Sequência artificial: polipeptídeo sintético

<400> 202

Val Ser Asp Val Pro Arg Asp Leu Glu Val Val Ala Ala Thr Pro Thr
 1 5 10 15
 Ser Leu Leu Ile Ser Trp Ser Ala Arg Leu Lys Val Ala Arg Tyr Tyr
 20 25 30
 Arg Ile Thr Tyr Gly Glu Thr Gly Gly Asn Ser Pro Val Gln Glu Phe
 35 40 45
 10 Thr Val Pro Lys Asn Val Tyr Thr Ala Thr Ile Ser Gly Leu Lys Pro
 50 55 60
 Gly Val Asp Tyr Thr Ile Thr Val Tyr Ala Val Thr Gly Val Arg Asn
 65 70 75 80
 Tyr Gly Pro Ile Ser Ile Asn Tyr Arg Thr
 15 85 90

<210> 203

<211> 98

<212> PRT

<213> Sequência artificial

20 <220>

<223> Descrição de Sequência artificial: polipeptídeo sintético

<400> 203

Gly Val Ser Asp Val Pro Arg Asp Leu Glu Val Val Ala Ala Thr Pro
 1 5 10 15
 25 Thr Ser Leu Leu Ile Ser Trp Ser Ala Arg Leu Lys Val Ala Arg Tyr
 20 25 30
 Tyr Arg Ile Thr Tyr Gly Glu Thr Gly Gly Asn Ser Pro Val Gln Glu
 35 40 45
 Phe Thr Val Pro Lys Asn Val Tyr Thr Ala Thr Ile Ser Gly Leu Lys
 30 50 55 60
 Pro Gly Val Asp Tyr Thr Ile Thr Val Tyr Ala Val Thr Arg Phe Arg
 65 70 75 80

Asp Tyr Gln Pro Ile Ser Ile Asn Tyr Arg Thr Glu Ile Asp Lys Pro

85

90

95

Cys Gln

<210> 204

5

<211> 45

<212> DNA

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Descrição de Sequência artificial: oligonucleotídeo sintético

10

<400> 204

taatacgact

cactataggg

acaattacta

tttacaatta

caatg

45

<210> 205

<211> 94

15

<212> DNA

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Descrição de Sequência artificial: oligonucleotídeo sintético

<400> 205

20

gggacaatta ctatttacao ttacaatggg ttctgatgtg ccgcgcgacc tggaagtggg

60

tgctgccacc

cccaccagcc

tgctgatcag

ctgg

94

<210> 206

25

<211> 57

<212> DNA

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Descrição de Sequência artificial: oligonucleotídeo sintético

30

<220>

<221> base_modificada

<222> (19) .. (20)

<223> a, c, g, t, desconhecido ou outro
 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (22)..(23)
 5 <223> a, c, g, t, desconhecido ou outro
 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (25)..(26)
 <223> a, c, g, t, desconhecido ou outro
 10 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (28)..(29)
 <223> a, c, g, t, desconhecido ou outro
 <220>
 15 <221> base_modificada
 <222> (31)..(32)
 <223> a, c, g, t, desconhecido ou outro
 <220>
 <221> base_modificada
 20 <222> (34)..(35)
 <223> a, c, g, t, desconhecido ou outro
 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (37)..(38)
 25 <223> a, c, g, t, desconhecido ou outro
 <400> 206
 agcctgctga tcagctggnn snnsnnsnns nnsnnsnns gatattaccg catcact
 57
 <210> 207
 30 <211> 66
 <212> DNA
 <213> Sequência artificial

<220>
 <223> Descrição de Sequência artificial: oligonucleotídeo sintético
 <400> 207
 aggcacagtg aactcctgga cagggctatt gcctcctggt tcgccgtaag tgatgcggta
 5 60
 atatcg
 66
 <210> 208
 <211> 48
 10 <212> DNA
 <213> Sequência artificial
 <220>
 <223> Descrição de Sequência artificial: oligonucleotídeo sintético
 <220>
 15 <221> base_modificada
 <222> (19)..(20)
 <223> a, c, g, t, desconhecido ou outro
 <220>
 <221> base_modificada
 20 <222> (22)..(23)
 <223> a, c, g, t, desconhecido ou outro
 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (25)..(26)
 25 <223> a, c, g, t, desconhecido ou outro
 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (28)..(29)
 <223> a, c, g, t, desconhecido ou outro
 30 <400> 208
 caggagtcca ctgtgcctnn snnsnnsnns acagctacca tcagcggc
 48

<210> 209
 <211> 63
 <212> DNA
 <213> Sequência artificial
 5 <220>
 <223> Descrição de Sequência artificial: oligonucleotídeo sintético
 <400> 209
 agtgacagca tacacagtga tggataatc aacgccaggt ttaaggccgc tgatggtagc
 60
 10 tgt
 63
 <210> 210
 <211> 54
 <212> DNA
 15 <213> Sequência artificial
 <220>
 <223> Descrição de Sequência artificial: oligonucleotídeo sintético
 <220>
 <221> base_modificada
 20 <222> (19)..(20)
 <223> a, c, g, t, desconhecido ou outro
 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (22)..(23)
 25 <223> a, c, g, t, desconhecido ou outro
 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (25)..(26)
 <223> a, c, g, t, desconhecido ou outro
 30 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (28)..(29)

<223> a, c, g, t, desconhecido ou outro

<220>

<221> base_modificada

<222> (31)..(32)

5 <223> a, c, g, t, desconhecido ou outro

<220>

<221> base_modificada

<222> (34)..(35)

<223> a, c, g, t, desconhecido ou outro

10 <400> 210

actgtgtatg ctgtcactnn snnnsnnsnns mnsnnsccaa tttccattaa ttac

54

<210> 211

<211> 60

15 <212> DNA

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Descrição de Sequência artificial: oligonucleotídeo sintético

<220>

20 <221> base_modificada

<222> (19)..(20)

<223> a, c, g, t, desconhecido ou outro

<220>

<221> base_modificada

25 <222> (22)..(23)

<223> a, c, g, t, desconhecido ou outro

<220>

<221> base_modificada

<222> (25)..(26)

30 <223> a, c, g, t, desconhecido ou outro

<220>

<221> base_modificada

<222> (28)..(29)
 <223> a, c, g, t, desconhecido ou outro
 <220>
 <221> base_modificada
 5 <222> (31)..(32)
 <223> a, c, g, t, desconhecido ou outro
 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (34)..(35)
 10 <223> a, c, g, t, desconhecido ou outro
 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (37)..(38)
 <223> a, c, g, t, desconhecido ou outro
 15 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (40)..(41)
 <223> a, c, g, t, desconhecido ou outro
 <400> 211
 20 actgtgtatg ctgtcactnn snnsnnsnns nnsnnsnnsn nsccaatttc cattaattac
 60
 <210> 212
 <211> 66
 <212> DNA
 25 <213> Sequência artificial
 <220>
 <223> Descrição de Sequência artificial: oligonucleotídeo sintético
 <220>
 <221> base_modificada
 30 <222> (19)..(20)
 <223> a, c, g, t, desconhecido ou outro
 <220>

<221> base_modificada
 <222> (22)..(23)
 <223> a, c, g, t, desconhecido ou outro
 <220>

5 <221> base_modificada
 <222> (25)..(26)
 <223> a, c, g, t, desconhecido ou outro
 <220>

<221> base_modificada
 10 <222> (28)..(29)
 <223> a, c, g, t, desconhecido ou outro
 <220>

<221> base_modificada
 <222> (31)..(32)
 15 <223> a, c, g, t, desconhecido ou outro
 <220>

<221> base_modificada
 <222> (34)..(35)
 <223> a, c, g, t, desconhecido ou outro
 20 <220>

<221> base_modificada
 <222> (37)..(38)
 <223> a, c, g, t, desconhecido ou outro
 <220>

25 <221> base_modificada
 <222> (40)..(41)
 <223> a, c, g, t, desconhecido ou outro
 <220>

<221> base_modificada
 30 <222> (43)..(44)
 <223> a, c, g, t, desconhecido ou outro
 <220>

<221> base_modificada
 <222> (46)..(47)
 <223> a, c, g, t, desconhecido ou outro
 <400> 212
 5 actgtgtatg ctgtcactnn snnnsnnnsnns nnsnnnsnnsn nsnnnsnnsc aatttccatt
 60
 aattac
 66
 <210> 213
 10 <211> 72
 <212> DNA
 <213> Seqüência artificial
 <220>
 <223> Descrição de Seqüência artificial: oligonucleotídeo sintético
 15 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (19)..(20)
 <223> a, c, g, t, desconhecido ou outro
 <220>
 20 <221> base_modificada
 <222> (22)..(23)
 <223> a, c, g, t, desconhecido ou outro
 <220>
 <221> base_modificada
 25 <222> (25)..(26)
 <223> a, c, g, t, desconhecido ou outro
 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (28)..(29)
 30 <223> a, c, g, t, desconhecido ou outro
 <220>
 <221> base_modificada

<222> (31)..(32)
 <223> a, c, g, t, desconhecido ou outro
 <220>
 <221> base_modificada
 5 <222> (34)..(35)
 <223> a, c, g, t, desconhecido ou outro
 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (37)..(38)
 10 <223> a, c, g, t, desconhecido ou outro
 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (40)..(41)
 <223> a, c, g, t, desconhecido ou outro
 15 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (43)..(44)
 <223> a, c, g, t, desconhecido ou outro
 <220>
 20 <221> base_modificada
 <222> (46)..(47)
 <223> a, c, g, t, desconhecido ou outro
 <220>
 <221> base_modificada
 25 <222> (49)..(50)
 <223> a, c, g, t, desconhecido ou outro
 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (52)..(53)
 30 <223> a, c, g, t, desconhecido ou outro
 <400> 213
 actgtgtatg ctgtcactnn snnnsnnsnns nnsnnsnnsn nsnnnsnnsnn snnsccaatt

60
tccattaatt ac

72

5 <210> 214

<211> 78

<212> DNA

<213> Sequência artificial.

<220>

<223> Descrição de Sequência artificial: oligonucleotídeo sintético

10 <220>

<221> base_modificada

<222> (19)..(20)

<223> a, c, g, t, desconhecido ou outro

<220>

15 <221> base_modificada

<222> (22)..(23)

<223> a, c, g, t, desconhecido ou outro

<220>

<221> base_modificada

20 <222> (25)..(26)

<223> a, c, g, t, desconhecido ou outro

<220>

<221> base_modificada

<222> (28)..(29)

25 <223> a, c, g, t, desconhecido ou outro

<220>

<221> base_modificada

<222> (31)..(32)

<223> a, c, g, t, desconhecido ou outro

30 <220>

<221> base_modificada

<222> (34)..(35)

<223> a, c, g, t, desconhecido ou outro

<220>

<221> base_modificada

<222> (37)..(38)

5 <223> a, c, g, t, desconhecido ou outro

<220>

<221> base_modificada

<222> (40)..(41)

<223> a, c, g, t, desconhecido ou outro

10 <220>

<221> base_modificada

<222> (43)..(44)

<223> a, c, g, t, desconhecido ou outro

<220>

15 <221> base_modificada

<222> (46)..(47)

<223> a, c, g, t, desconhecido ou outro

<220>

<221> base_modificada

20 <222> (49)..(50)

<223> a, c, g, t, desconhecido ou outro

<220>

<221> base_modificada

<222> (52)..(53)

25 <223> a, c, g, t, desconhecido ou outro

<220>

<221> base_modificada

<222> (55)..(56)

<223> a, c, g, t, desconhecido ou outro

30 <220>

<221> base_modificada

<222> (58)..(59)

<223> a, c, g, t, desconhecido ou outro

<400> 214

actgtgtatg ctgtcactnn snnnsnnsnns nnsnnsnnsn nsnnnsnnsn snnnsnnsnns
60

5 ccaattttcca ttaattac
78

<210> 215

<211> 63

<212> DNA

10 <213> Sequência artificial

<220>

<223> Descrição de Sequência artificial: oligonucleotídeo sintético

<400> 215

15 ttaaatagcg gatgccttgt cgtcgctgc cttgtagtct gtgcggtaat taatggaaat
60
tgg
63

<210> 216

<211> 54

20 <212> DNA

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Descrição de Sequência artificial: oligonucleotídeo sintético

<400> 216

25 tttttttttt tttttttttt aaatagcgga tgccttgctg tcgctgctct tgta
54

<210> 217

<211> 57

<212> DNA

30 <213> Sequência artificial

<220>

<223> Descrição de Sequência artificial: oligonucleotídeo sintético

<400> 217

agcctgctga tcagctggtc cccgtacctg cgcgtcgccc gatattaccg catcact
57

<210> 218

5 <211> 48

<212> DNA

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Descrição de Sequência artificial: oligonucleotídeo sintético

10 <400> 218

caggagtcca ctgtgccttc ctccgcccgc acagctacca tcagcggc
48

<210> 219

<211> 66

15 <212> DNA

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Descrição de Sequência artificial: oligonucleotídeo sintético

<400> 219

20 actgtgtatg ctgtcactcc gtccaacatc atcggccgtc actatggccc aatttcatt
60

aattac

66

<210> 220

25 <211> 18

<212> DNA

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Descrição de Sequência artificial: oligonucleotídeo sintético

30 <400> 220

agcctgctga tcagctgg
18

- <210> 221
 <211> 18
 <212> DNA
 <213> Sequência artificial
 5 <220>
 <223> Descrição de Sequência artificial: oligonucleotídeo sintético
 <400> 221
 caggagttca ctgtgcct
 18
 10 <210> 222
 <211> 18
 <212> DNA
 <213> Sequência artificial
 <220>
 15 <223> Descrição de Sequência artificial: oligonucleotídeo sintético
 <400> 222
 actgtgtatg ctgtcact
 18
 <210> 223
 20 <211> 57
 <212> DNA
 <213> Sequência artificial
 <220>
 <223> Descrição de Sequência artificial: oligonucleotídeo sintético
 25 <400> 223
 agcctgctga tcagctggtc tgcgcgtctg aaagttgcgc gatattaccg catcact
 57
 <210> 224
 <211> 48
 30 <212> DNA
 <213> Sequência artificial
 <220>

<223> Descrição de Seqüência artificial: oligonucleotídeo sintético

 $\langle 400 \rangle$ 224

caggagttca ctgtgcctaa aaacgtttac acagctacca tcagcggc

5 <210> 225

<211> 7

<212> PRT

<213> Seqüência artificial

<220>

10 <223> Descrição de Sequência artificial: peptídeo sintético

<400> 225

Glu Ile Asp Lys Pro Cys Gln

1 5

<210> 226

15 <211> 98

<212> PRT

<213> Seqüência artificial

 $\langle 220 \rangle$

<223> Descrição de Seqüência artificial: Construto sintético

λ₁ 20 <400> 226

Gly Val Ser Asp Val Pro Arg Asp Leu Glu Val Val Ala Ala Thr Pro

1 5 10 15

Thr Ser Leu Leu Ile Ser Trp Ser Ala Arg Leu Lys Val Ala Arg Tyr

20 25 30

25 Tyr Arg Ile Thr Tyr Gly Glu Thr Gly Gly Asn Ser Pro Val Gln Glu

35 40 45

Phe Thr Val Pro Lys Asn Val Tyr Thr Ala Thr Ile Ser Gly Leu Lys

50 55 60

Pro Gly Val Asp Tyr Thr Ile Thr Val Tyr Ala Val Thr Arg Phe Arg

30 65 70 75 80

Asp Tyr Gln Pro Ile Ser Ile Asn Tyr Arg Thr Glu Ile Asp Lys Pro

85 90 95

Ser Gln
 <210> 227
 <211> 95
 <212> PRT
 5 <213> Sequência artificial
 <220>
 <223> Descrição de Sequência artificial: construto sintético
 <400> 227
 Gly Val Ser Asp Val Pro Arg Asp Leu Glu Val Val Ala Ala Thr Pro
 10 1 5 10 15
 Thr Ser Leu Leu Ile Ser Trp Asp Ala Pro Ala Val Thr Val Arg Tyr
 20 25 30
 Tyr Arg Ile Thr Tyr Gly Glu Thr Gly Gly Asn Ser Pro Val Gln Glu
 35 40 45
 15 Phe Thr Val Pro Gly Ser Lys Ser Thr Ala Thr Ile Ser Gly Leu Lys
 50 55 60
 Pro Gly Val Asp Tyr Thr Ile Thr Gly Tyr Ala Val Thr Gly Ser Gly
 65 70 75 80
 Glu Ser Pro Ala Ser Ser Lys Pro Ile Ser Ile Asn Tyr Arg Thr
 20 85 90 95
 <210> 228
 <211> 707
 <212> PRT
 <213> Sequência artificial
 25 <220>
 <223> Descrição de Sequência artificial: construto sintético
 <400> 228
 Met Lys Trp Val Thr Phe Ile Ser Leu Leu Phe Leu Phe Ser Ser Ala
 1 5 10 15
 30 Tyr Ser Arg Gly Val Phe Arg Arg Asp Ala His Lys Ser Glu Val Ala
 20 25 30
 His Arg Phe Lys Asp Leu Gly Glu Glu Asn Phe Lys Ala Leu Val Leu

	35	40	45
	Ile Ala Phe Ala Gln Tyr Leu Gln Gln Cys Pro Phe Glu Asp His Val		
	50	55	60
	Lys Leu Val Asn Glu Val Thr Glu Phe Ala Lys Thr Cys Val Ala Asp		
5	65	70	75 80
	Glu Ser Ala Glu Asn Cys Asp Lys Ser Leu His Thr Leu Phe Gly Asp		
	85	90	95
	Lys Leu Cys Thr Val Ala Thr Leu Arg Glu Thr Tyr Gly Glu Met Ala		
	100	105	110
10	Asp Cys Cys Ala Lys Gln Glu Pro Glu Arg Asn Glu Cys Phe Leu Gln		
	115	120	125
	His Lys Asp Asp Asn Pro Asn Leu Pro Arg Leu Val Arg Pro Glu Val		
	130	135	140
	Asp Val Met Cys Thr Ala Phe His Asp Asn Glu Glu Thr Phe Leu Lys		
15	145	150	155 160
	Lys Tyr Leu Tyr Glu Ile Ala Arg Arg His Pro Tyr Phe Tyr Ala Pro		
	165	170	175
	Glu Leu Leu Phe Phe Ala Lys Arg Tyr Lys Ala Ala Phe Thr Glu Cys		
	180	185	190
20	Cys Gln Ala Ala Asp Lys Ala Ala Cys Leu Leu Pro Lys Leu Asp Glu		
	195	200	205
	Leu Arg Asp Glu Gly Lys Ala Ser Ser Ala Lys Gln Arg Leu Lys Cys		
	210	215	220
	Ala Ser Leu Gln Lys Phe Gly Glu Arg Ala Phe Lys Ala Trp Ala Val		
25	225	230	235 240
	Ala Arg Leu Ser Gln Arg Phe Pro Lys Ala Glu Phe Ala Glu Val Ser		
	245	250	255
	Lys Leu Val Thr Asp Leu Thr Lys Val His Thr Glu Cys Cys His Gly		
	260	265	270
30	Asp Leu Leu Glu Cys Ala Asp Asp Arg Ala Asp Leu Ala Lys Tyr Ile		
	275	280	285
	Cys Glu Asn Gln Asp Ser Ile Ser Ser Lys Leu Lys Glu Cys Cys Glu		

	290		295		300											
	Lys	Pro	Leu	Leu	Glu	Lys	Ser	His	Cys	Ile	Ala	Glu	Val	Glu	Asn	Asp
	305				310					315					320	
	Glu	Met	Pro	Ala	Asp	Leu	Pro	Ser	Leu	Ala	Ala	Asp	Phe	Val	Glu	Ser
5					325					330					335	
	Lys	Asp	Val	Cys	Lys	Asn	Tyr	Ala	Glu	Ala	Lys	Asp	Val	Phe	Leu	Gly
					340					345					350	
	Met	Phe	Leu	Tyr	Glu	Tyr	Ala	Arg	Arg	His	Pro	Asp	Tyr	Ser	Val	Val
					355					360					365	
10	Leu	Leu	Leu	Arg	Leu	Ala	Lys	Thr	Tyr	Glu	Thr	Thr	Leu	Glu	Lys	Cys
					370					375					380	
	Cys	Ala	Ala	Ala	Asp	Pro	His	Glu	Cys	Tyr	Ala	Lys	Val	Phe	Asp	Glu
	385				390					395					400	
	Phe	Lys	Pro	Leu	Val	Glu	Glu	Pro	Gln	Asn	Leu	Ile	Lys	Gln	Asn	Cys
15					405					410					415	
	Glu	Leu	Phe	Glu	Gln	Leu	Gly	Glu	Tyr	Lys	Phe	Gln	Asn	Ala	Leu	Leu
					420					425					430	
	Val	Arg	Tyr	Thr	Lys	Lys	Val	Pro	Gln	Val	Ser	Thr	Pro	Thr	Leu	Val
					435					440					445	
20	Glu	Val	Ser	Arg	Asn	Leu	Gly	Lys	Val	Gly	Ser	Lys	Cys	Cys	Lys	His
					450					455					460	
	Pro	Glu	Ala	Lys	Arg	Met	Pro	Cys	Ala	Glu	Asp	Tyr	Leu	Ser	Val	Val
	465				470					475					480	
	Leu	Asn	Gln	Leu	Cys	Val	Leu	His	Glu	Lys	Thr	Pro	Val	Ser	Asp	Arg
25					485					490					495	
	Val	Thr	Lys	Cys	Cys	Thr	Glu	Ser	Leu	Val	Asn	Arg	Arg	Pro	Cys	Phe
					500					505					510	
	Ser	Ala	Leu	Glu	Val	Asp	Glu	Thr	Tyr	Val	Pro	Lys	Glu	Phe	Asn	Ala
					515					520					525	
30	Glu	Thr	Phe	Thr	Phe	His	Ala	Asp	Ile	Cys	Thr	Leu	Ser	Glu	Lys	Glu
					530					535					540	
	Arg	Gln	Ile	Lys	Lys	Gln	Thr	Ala	Leu	Val	Glu	Leu	Val	Lys	His	Lys

545 550 555 560
 Pro Lys Ala Thr Lys Glu Gln Leu Lys Ala Val Met Asp Asp Phe Ala
 565 570 575
 Ala Phe Val Glu Lys Cys Cys Lys Ala Asp Asp Lys Glu Thr Cys Phe
 5 580 585 590
 Ala Glu Glu Gly Lys Lys Leu Val Ala Ala Ser Gln Ala Ala Leu Gly
 595 600 605
 Leu Pro Ser Thr Ser Thr Ser Thr Gly Val Ser Asp Val Pro Arg Asp
 610 615 620
 10 Leu Glu Val Val Ala Ala Thr Pro Thr Ser Leu Leu Ile Ser Trp Ser
 625 630 635 640
 Ala Arg Leu Lys Val Ala Arg Tyr Tyr Arg Ile Thr Tyr Gly Glu Thr
 645 650 655
 Gly Gly Asn Ser Pro Val Gln Glu Phe Thr Val Pro Lys Asn Val Tyr
 15 660 665 670
 Thr Ala Thr Ile Ser Gly Leu Lys Pro Gly Val Asp Tyr Thr Ile Thr
 675 680 685
 Val Tyr Ala Val Thr Arg Phe Arg Asp Tyr Gln Pro Ile Ser Ile Asn
 690 695 700
 20 Tyr Arg Thr
 705
 <210> 229
 <211> 682
 <212> PRT
 25 <213> Sequência artificial
 <220>
 <223> Descrição de Sequência artificial: construto sintético
 <400> 229
 Met Gly Val Ser Asp Val Pro Arg Asp Leu Glu Val Val Ala Ala Thr
 30 1 5 10 15
 Pro Thr Ser Leu Leu Ile Ser Trp Ser Ala Arg Leu Lys Val Ala Arg
 20 25 30

Tyr Tyr Arg Ile Thr Tyr Gly Glu Thr Gly Gly Asn Ser Pro Val Gln
 35 40 45
 Glu Phe Thr Val Pro Lys Asn Val Tyr Thr Ala Thr Ile Ser Gly Leu
 50 55 60
 5 Lys Pro Gly Val Asp Tyr Thr Ile Thr Val Tyr Ala Val Thr Arg Phe
 65 70 75 80
 Arg Asp Tyr Gln Pro Ile Ser Ile Asn Tyr Arg Thr Pro Ser Thr Ser
 85 90 95
 Thr Ser Thr Ala His Lys Ser Glu Val Ala His Arg Phe Lys Asp Leu
 10 100 105 110
 Gly Glu Glu Asn Phe Lys Ala Leu Val Leu Ile Ala Phe Ala Gln Tyr
 115 120 125
 Leu Gln Gln Cys Pro Phe Glu Asp His Val Lys Leu Val Asn Glu Val
 130 135 140
 15 Thr Glu Phe Ala Lys Thr Cys Val Ala Asp Glu Ser Ala Glu Asn Cys
 145 150 155 160
 Asp Lys Ser Leu His Thr Leu Phe Gly Asp Lys Leu Cys Thr Val Ala
 165 170 175
 Thr Leu Arg Glu Thr Tyr Gly Glu Met Ala Asp Cys Cys Ala Lys Gln
 20 180 185 190
 Glu Pro Glu Arg Asn Glu Cys Phe Leu Gln His Lys Asp Asp Asn Pro
 195 200 205
 Asn Leu Pro Arg Leu Val Arg Pro Glu Val Asp Val Met Cys Thr Ala
 210 215 220
 25 Phe His Asp Asn Glu Glu Thr Phe Leu Lys Lys Tyr Leu Tyr Glu Ile
 225 230 235 240
 Ala Arg Arg His Pro Tyr Phe Tyr Ala Pro Glu Leu Leu Phe Phe Ala
 245 250 255
 Lys Arg Tyr Lys Ala Ala Phe Thr Glu Cys Cys Gln Ala Ala Asp Lys
 30 260 265 270
 Ala Ala Cys Leu Leu Pro Lys Leu Asp Glu Leu Arg Asp Glu Gly Lys
 275 280 285

Ala Ser Ser Ala Lys Gln Arg Leu Lys Cys Ala Ser Leu Gln Lys Phe
 290 295 300
 Gly Glu Arg Ala Phe Lys Ala Trp Ala Val Ala Arg Leu Ser Gln Arg
 305 310 315 320
 5 Phe Pro Lys Ala Glu Phe Ala Glu Val Ser Lys Leu Val Thr Asp Leu
 325 330 335
 Thr Lys Val His Thr Glu Cys Cys His Gly Asp Leu Leu Glu Cys Ala
 340 345 350
 Asp Asp Arg Ala Asp Leu Ala Lys Tyr Ile Cys Glu Asn Gln Asp Ser
 10 355 360 365
 Ile Ser Ser Lys Leu Lys Glu Cys Cys Glu Lys Pro Leu Leu Glu Lys
 370 375 380
 Ser His Cys Ile Ala Glu Val Glu Asn Asp Glu Met Pro Ala Asp Leu
 385 390 395 400
 15 Pro Ser Leu Ala Ala Asp Phe Val Glu Ser Lys Asp Val Cys Lys Asn
 405 410 415
 Tyr Ala Glu Ala Lys Asp Val Phe Leu Gly Met Phe Leu Tyr Glu Tyr
 420 425 430
 Ala Arg Arg His Pro Asp Tyr Ser Val Val Leu Leu Leu Arg Leu Ala
 20 435 440 445
 Lys Thr Tyr Glu Thr Thr Leu Glu Lys Cys Cys Ala Ala Ala Asp Pro
 450 455 460
 His Glu Cys Tyr Ala Lys Val Phe Asp Glu Phe Lys Pro Leu Val Glu
 465 470 475 480
 25 Glu Pro Gln Asn Leu Ile Lys Gln Asn Cys Glu Leu Phe Glu Gln Leu
 485 490 495
 Gly Glu Tyr Lys Phe Gln Asn Ala Leu Leu Val Arg Tyr Thr Lys Lys
 500 505 510
 Val Pro Gln Val Ser Thr Pro Thr Leu Val Glu Val Ser Arg Asn Leu
 30 515 520 525
 Gly Lys Val Gly Ser Lys Cys Cys Lys His Pro Glu Ala Lys Arg Met
 530 535 540

Pro Cys Ala Glu Asp Tyr Leu Ser Val Val Leu Asn Gln Leu Cys Val
545 550 555 560
Leu His Glu Lys Thr Pro Val Ser Asp Arg Val Thr Lys Cys Cys Thr
565 570 575
5 Glu Ser Leu Val Asn Arg Arg Pro Cys Phe Ser Ala Leu Glu Val Asp
580 585 590
Glu Thr Tyr Val Pro Lys Glu Phe Asn Ala Glu Thr Phe Thr Phe His
595 600 605
Ala Asp Ile Cys Thr Leu Ser Glu Lys Glu Arg Gln Ile Lys Lys Gln
10 610 615 620
Thr Ala Leu Val Glu Leu Val Lys His Lys Pro Lys Ala Thr Lys Glu
625 630 635 640
Gln Leu Lys Ala Val Met Asp Asp Phe Ala Ala Phe Val Glu Lys Cys
645 650 655
15 Cys Lys Ala Asp Asp Lys Glu Thr Cys Phe Ala Glu Glu Gly Lys Lys
660 665 670
Leu Val Ala Ala Ser Gln Ala Ala Leu Gly
675 680
<210> 230
20 <211> 707
<212> PRT
<213> Sequência artificial
<220>
<223> Descrição de Sequência artificial: construto sintético
25 <400> 230
Met Lys Trp Val Thr Phe Ile Ser Leu Leu Phe Leu Phe Ser Ser Ala
1 5 10 15
Tyr Ser Arg Gly Val Phe Arg Arg Asp Ala His Lys Ser Glu Val Ala
20 25 30
30 His Arg Phe Lys Asp Leu Gly Glu Glu Asn Phe Lys Ala Leu Val Leu
35 40 45
Ile Ala Phe Ala Gln Tyr Leu Gln Gln Cys Pro Phe Glu Asp His Val

50 55 60
 Lys Leu Val Asn Glu Val Thr Glu Phe Ala Lys Thr Cys Val Ala Asp
 65 70 75 80
 Glu Ser Ala Glu Asn Cys Asp Lys Ser Leu His Thr Leu Phe Gly Asp
 5 85 90 95
 Lys Leu Cys Thr Val Ala Thr Leu Arg Glu Thr Tyr Gly Glu Met Ala
 100 105 110
 Asp Cys Cys Ala Lys Gln Glu Pro Glu Arg Asn Glu Cys Phe Leu Gln
 115 120 125
 10 His Lys Asp Asp Asn Pro Asn Leu Pro Arg Leu Val Arg Pro Glu Val
 130 135 140
 Asp Val Met Cys Thr Ala Phe His Asp Asn Glu Glu Thr Phe Leu Lys
 145 150 155 160
 Lys Tyr Leu Tyr Glu Ile Ala Arg Arg His Pro Tyr Phe Tyr Ala Pro
 15 165 170 175
 Glu Leu Leu Phe Phe Ala Lys Arg Tyr Lys Ala Ala Phe Thr Glu Cys
 180 185 190
 Cys Gln Ala Ala Asp Lys Ala Ala Cys Leu Leu Pro Lys Leu Asp Glu
 195 200 205
 20 Leu Arg Asp Glu Gly Lys Ala Ser Ser Ala Lys Gln Arg Leu Lys Cys
 210 215 220
 Ala Ser Leu Gln Lys Phe Gly Glu Arg Ala Phe Lys Ala Trp Ala Val
 225 230 235 240
 Ala Arg Leu Ser Gln Arg Phe Pro Lys Ala Glu Phe Ala Glu Val Ser
 25 245 250 255
 Lys Leu Val Thr Asp Leu Thr Lys Val His Thr Glu Cys Cys His Gly
 260 265 270
 Asp Leu Leu Glu Cys Ala Asp Asp Arg Ala Asp Leu Ala Lys Tyr Ile
 275 280 285
 30 Cys Glu Asn Gln Asp Ser Ile Ser Ser Lys Leu Lys Glu Cys Cys Glu
 290 295 300
 Lys Pro Leu Leu Glu Lys Ser His Cys Ile Ala Glu Val Glu Asn Asp

305 310 315 320
 Glu Met Pro Ala Asp Leu Pro Ser Leu Ala Ala Asp Phe Val Glu Ser
 325 330 335
 Lys Asp Val Cys Lys Asn Tyr Ala Glu Ala Lys Asp Val Phe Leu Gly
 5 340 345 350
 Met Phe Leu Tyr Glu Tyr Ala Arg Arg His Pro Asp Tyr Ser Val Val
 355 360 365
 Leu Leu Leu Arg Leu Ala Lys Thr Tyr Glu Thr Thr Leu Glu Lys Cys
 370 375 380
 10 Cys Ala Ala Ala Asp Pro His Glu Cys Tyr Ala Lys Val Phe Asp Glu
 385 390 395 400
 Phe Lys Pro Leu Val Glu Glu Pro Gln Asn Leu Ile Lys Gln Asn Cys
 405 410 415
 Glu Leu Phe Glu Gln Leu Gly Glu Tyr Lys Phe Gln Asn Ala Leu Leu
 15 420 425 430
 Val Arg Tyr Thr Lys Lys Val Pro Gln Val Ser Thr Pro Thr Leu Val
 435 440 445
 Glu Val Ser Arg Asn Leu Gly Lys Val Gly Ser Lys Cys Cys Lys His
 450 455 460
 20 Pro Glu Ala Lys Arg Met Pro Cys Ala Glu Asp Tyr Leu Ser Val Val
 465 470 475 480
 Leu Asn Gln Leu Cys Val Leu His Glu Lys Thr Pro Val Ser Asp Arg
 485 490 495
 Val Thr Lys Cys Cys Thr Glu Ser Leu Val Asn Arg Arg Pro Cys Phe
 25 500 505 510
 Ser Ala Leu Glu Val Asp Glu Thr Tyr Val Pro Lys Glu Phe Asn Ala
 515 520 525
 Glu Thr Phe Thr Phe His Ala Asp Ile Cys Thr Leu Ser Glu Lys Glu
 530 535 540
 30 Arg Gln Ile Lys Lys Gln Thr Ala Leu Val Glu Leu Val Lys His Lys
 545 550 555 560
 Pro Lys Ala Thr Lys Glu Gln Leu Lys Ala Val Met Asp Asp Phe Ala

565 570 575
 Ala Phe Val Glu Lys Cys Cys Lys Ala Asp Asp Lys Glu Thr Cys Phe
 580 585 590
 Ala Glu Glu Gly Lys Lys Leu Val Ala Ala Ser Gln Ala Ala Leu Gly
 595 600 605
 Leu Glu Ile Asp Lys Pro Ser Gln Gly Val Ser Asp Val Pro Arg Asp
 610 615 620
 Leu Glu Val Val Ala Ala Thr Pro Thr Ser Leu Leu Ile Ser Trp Ser
 625 630 635 640
 10 Ala Arg Leu Lys Val Ala Arg Tyr Tyr Arg Ile Thr Tyr Gly Glu Thr
 645 650 655
 Gly Gly Asn Ser Pro Val Gln Glu Phe Thr Val Pro Lys Asn Val Tyr
 660 665 670
 Thr Ala Thr Ile Ser Gly Leu Lys Pro Gly Val Asp Tyr Thr Ile Thr
 15 675 680 685
 Val Tyr Ala Val Thr Arg Phe Arg Asp Tyr Gln Pro Ile Ser Ile Asn
 690 695 700
 Tyr Arg Thr
 705
 20 <210> 231
 <211> 710
 <212> PRT
 <213> Sequência artificial
 <220>
 25 <223> Descrição de Sequência artificial: construto sintético
 <400> 231
 Met Lys Trp Val Thr Phe Ile Ser Leu Leu Phe Leu Phe Ser Ser Ala
 1 5 10 15
 Tyr Ser Arg Gly Val Phe Arg Arg Asp Ala His Lys Ser Glu Val Ala
 30 20 25 30
 His Arg Phe Lys Asp Leu Gly Glu Glu Asn Phe Lys Ala Leu Val Leu
 35 40 45

Ile Ala Phe Ala Gln Tyr Leu Gln Gln Cys Pro Phe Glu Asp His Val
 50 55 60
 Lys Leu Val Asn Glu Val Thr Glu Phe Ala Lys Thr Cys Val Ala Asp
 65 70 75 80
 5 Glu Ser Ala Glu Asn Cys Asp Lys Ser Leu His Thr Leu Phe Gly Asp
 85 90 95
 Lys Leu Cys Thr Val Ala Thr Leu Arg Glu Thr Tyr Gly Glu Met Ala
 100 105 110
 Asp Cys Cys Ala Lys Gln Glu Pro Glu Arg Asn Glu Cys Phe Leu Gln
 10 115 120 125
 His Lys Asp Asp Asn Pro Asn Leu Pro Arg Leu Val Arg Pro Glu Val
 130 135 140
 Asp Val Met Cys Thr Ala Phe His Asp Asn Glu Glu Thr Phe Leu Lys
 145 150 155 160
 15 Lys Tyr Leu Tyr Glu Ile Ala Arg Arg His Pro Tyr Phe Tyr Ala Pro
 165 170 175
 Glu Leu Leu Phe Phe Ala Lys Arg Tyr Lys Ala Ala Phe Thr Glu Cys
 180 185 190
 Cys Gln Ala Ala Asp Lys Ala Ala Cys Leu Leu Pro Lys Leu Asp Glu
 20 195 200 205
 Leu Arg Asp Glu Gly Lys Ala Ser Ser Ala Lys Gln Arg Leu Lys Cys
 210 215 220
 Ala Ser Leu Gln Lys Phe Gly Glu Arg Ala Phe Lys Ala Trp Ala Val
 225 230 235 240
 25 Ala Arg Leu Ser Gln Arg Phe Pro Lys Ala Glu Phe Ala Glu Val Ser
 245 250 255
 Lys Leu Val Thr Asp Leu Thr Lys Val His Thr Glu Cys Cys His Gly
 260 265 270
 Asp Leu Leu Glu Cys Ala Asp Asp Arg Ala Asp Leu Ala Lys Tyr Ile
 30 275 280 285
 Cys Glu Asn Gln Asp Ser Ile Ser Ser Lys Leu Lys Glu Cys Cys Glu
 290 295 300

Lys Pro Leu Leu Glu Lys Ser His Cys Ile Ala Glu Val Glu Asn Asp
 305 310 315 320
 Glu Met Pro Ala Asp Leu Pro Ser Leu Ala Ala Asp Phe Val Glu Ser
 325 330 335
 5 Lys Asp Val Cys Lys Asn Tyr Ala Glu Ala Lys Asp Val Phe Leu Gly
 340 345 350
 Met Phe Leu Tyr Glu Tyr Ala Arg Arg His Pro Asp Tyr Ser Val Val
 355 360 365
 Leu Leu Leu Arg Leu Ala Lys Thr Tyr Glu Thr Thr Leu Glu Lys Cys
 10 370 375 380
 Cys Ala Ala Ala Asp Pro His Glu Cys Tyr Ala Lys Val Phe Asp Glu
 385 390 395 400
 Phe Lys Pro Leu Val Glu Glu Pro Gln Asn Leu Ile Lys Gln Asn Cys
 405 410 415
 15 Glu Leu Phe Glu Gln Leu Gly Glu Tyr Lys Phe Gln Asn Ala Leu Leu
 420 425 430
 Val Arg Tyr Thr Lys Lys Val Pro Gln Val Ser Thr Pro Thr Leu Val
 435 440 445
 Glu Val Ser Arg Asn Leu Gly Lys Val Gly Ser Lys Cys Cys Lys His
 20 450 455 460
 Pro Glu Ala Lys Arg Met Pro Cys Ala Glu Asp Tyr Leu Ser Val Val
 465 470 475 480
 Leu Asn Gln Leu Cys Val Leu His Glu Lys Thr Pro Val Ser Asp Arg
 485 490 495
 25 Val Thr Lys Cys Cys Thr Glu Ser Leu Val Asn Arg Arg Pro Cys Phe
 500 505 510
 Ser Ala Leu Glu Val Asp Glu Thr Tyr Val Pro Lys Glu Phe Asn Ala
 515 520 525
 Glu Thr Phe Thr Phe His Ala Asp Ile Cys Thr Leu Ser Glu Lys Glu
 30 530 535 540
 Arg Gln Ile Lys Lys Gln Thr Ala Leu Val Glu Leu Val Lys His Lys
 545 550 555 560

[illegible]

	35	40	45
	Ile	Ala	Phe
	Ala	Gln	Tyr
	Leu	Gln	Gln
	Cys	Pro	Phe
	Glu	Asp	His
	Val		
	50	55	60
	Lys	Leu	Val
	Asn	Glu	Val
	Thr	Glu	Phe
	Ala	Lys	Thr
	Cys	Val	Ala
5	65	70	75
	80		
	Glu	Ser	Ala
	Glu	Asn	Cys
	Asp	Lys	Ser
	Leu	His	Thr
	Leu	Phe	Gly
	Asp		
	85	90	95
	Lys	Leu	Cys
	Thr	Val	Ala
	Thr	Leu	Arg
	Glu	Thr	Tyr
	Gly	Glu	Met
	Ala		
	100	105	110
10	Asp	Cys	Cys
	Ala	Lys	Gln
	Glu	Pro	Glu
	Arg	Asn	Glu
	Cys	Phe	Leu
	Gln		
	115	120	125
	His	Lys	Asp
	Asp	Asn	Pro
	Asn	Leu	Pro
	Arg	Leu	Val
	Arg	Pro	Glu
	Val		
	130	135	140
	Asp	Val	Met
	Cys	Thr	Ala
	Phe	His	Asp
	Asn	Glu	Glu
	Thr	Phe	Leu
	Lys		
15	145	150	155
	160		
	Lys	Tyr	Leu
	Tyr	Glu	Ile
	Ala	Arg	Arg
	His	Pro	Tyr
	Phe	Tyr	Ala
	Pro		
	165	170	175
	Glu	Leu	Leu
	Phe	Phe	Ala
	Lys	Arg	Tyr
	Lys	Ala	Ala
	Phe	Thr	Glu
	Cys		
	180	185	190
20	Cys	Gln	Ala
	Ala	Asp	Lys
	Ala	Ala	Cys
	Leu	Leu	Pro
	Lys	Leu	Asp
	Glu		
	195	200	205
	Leu	Arg	Asp
	Glu	Gly	Lys
	Ala	Ser	Ser
	Ala	Lys	Gln
	Arg	Leu	Lys
	Cys		
	210	215	220
	Ala	Ser	Leu
	Gln	Lys	Phe
	Gly	Glu	Arg
	Ala	Phe	Lys
	Ala	Trp	Ala
	Val		
25	225	230	235
	240		
	Ala	Arg	Leu
	Ser	Gln	Arg
	Phe	Pro	Lys
	Ala	Glu	Phe
	Ala	Glu	Val
	Ser		
	245	250	255
	Lys	Leu	Val
	Thr	Asp	Leu
	Thr	Lys	Val
	His	Thr	Glu
	Cys	Cys	His
	Gly		
	260	265	270
30	Asp	Leu	Leu
	Glu	Cys	Ala
	Asp	Asp	Arg
	Ala	Asp	Leu
	Ala	Lys	Tyr
	Ile		
	275	280	285
	Cys	Glu	Asn
	Gln	Asp	Ser
	Ile	Ser	Ser
	Lys	Leu	Lys
	Glu	Cys	Cys
	Glu		

290 295 300
 Lys Pro Leu Leu Glu Lys Ser His Cys Ile Ala Glu Val Glu Asn Asp
 305 310 315 320
 Glu Met Pro Ala Asp Leu Pro Ser Leu Ala Ala Asp Phe Val Glu Ser
 5 325 330 335
 Lys Asp Val Cys Lys Asn Tyr Ala Glu Ala Lys Asp Val Phe Leu Gly
 340 345 350
 Met Phe Leu Tyr Glu Tyr Ala Arg Arg His Pro Asp Tyr Ser Val Val
 355 360 365
 10 Leu Leu Leu Arg Leu Ala Lys Thr Tyr Glu Thr Thr Leu Glu Lys Cys
 370 375 380
 Cys Ala Ala Ala Asp Pro His Glu Cys Tyr Ala Lys Val Phe Asp Glu
 385 390 395 400
 Phe Lys Pro Leu Val Glu Glu Pro Gln Asn Leu Ile Lys Gln Asn Cys
 15 405 410 415
 Glu Leu Phe Glu Gln Leu Gly Glu Tyr Lys Phe Gln Asn Ala Leu Leu
 420 425 430
 Val Arg Tyr Thr Lys Lys Val Pro Gln Val Ser Thr Pro Thr Leu Val
 435 440 445
 20 Glu Val Ser Arg Asn Leu Gly Lys Val Gly Ser Lys Cys Cys Lys His
 450 455 460
 Pro Glu Ala Lys Arg Met Pro Cys Ala Glu Asp Tyr Leu Ser Val Val
 465 470 475 480
 Leu Asn Gln Leu Cys Val Leu His Glu Lys Thr Pro Val Ser Asp Arg
 25 485 490 495
 Val Thr Lys Cys Cys Thr Glu Ser Leu Val Asn Arg Arg Pro Cys Phe
 500 505 510
 Ser Ala Leu Glu Val Asp Glu Thr Tyr Val Pro Lys Glu Phe Asn Ala
 515 520 525
 30 Glu Thr Phe Thr Phe His Ala Asp Ile Cys Thr Leu Ser Glu Lys Glu
 530 535 540
 Arg Gln Ile Lys Lys Gln Thr Ala Leu Val Glu Leu Val Lys His Lys

545 550 555 560
 Pro Lys Ala Thr Lys Glu Gln Leu Lys Ala Val Met Asp Asp Phe Ala
 565 570 575
 Ala Phe Val Glu Lys Cys Cys Lys Ala Asp Asp Lys Glu Thr Cys Phe
 5 580 585 590
 Ala Glu Glu Gly Lys Lys Leu Val Ala Ala Ser Gln Ala Ala Leu Gly
 595 600 605
 Leu Gly Ser Gly Ser Gly Ser Gly Ser Gly Ser Gly Ser Gly Ser Gly
 610 615 620
 10 Ser Gly Ser Gly Ser Gly Val Ser Asp Val Pro Arg Asp Leu Glu Val
 625 630 635 640
 Val Ala Ala Thr Pro Thr Ser Leu Leu Ile Ser Trp Ser Ala Arg Leu
 645 650 655
 Lys Val Ala Arg Tyr Tyr Arg Ile Thr Tyr Gly Glu Thr Gly Gly Asn
 15 660 665 670
 Ser Pro Val Gln Glu Phe Thr Val Pro Lys Asn Val Tyr Thr Ala Thr
 675 680 685
 Ile Ser Gly Leu Lys Pro Gly Val Asp Tyr Thr Ile Thr Val Tyr Ala
 690 695 700
 20 Val Thr Arg Phe Arg Asp Tyr Gln Pro Ile Ser Ile Asn Tyr Arg Thr
 705 710 715 720
 <210> 233
 <211> 682
 <212> PRT
 25 <213> Sequência artificial
 <220>
 <223> Descrição de Sequência artificial: construto sintético
 <400> 233
 Met Gly Val Ser Asp Val Pro Arg Asp Leu Glu Val Val Ala Ala Thr
 30 1 5 10 15
 Pro Thr Ser Leu Leu Ile Ser Trp Ser Ala Arg Leu Lys Val Ala Arg
 20 25 30

Tyr Tyr Arg Ile Thr Tyr Gly Glu Thr Gly Gly Asn Ser Pro Val Gln
 35 40 45
 Glu Phe Thr Val Pro Lys Asn Val Tyr Thr Ala Thr Ile Ser Gly Leu
 50 55 60
 5 Lys Pro Gly Val Asp Tyr Thr Ile Thr Val Tyr Ala Val Thr Arg Phe
 65 70 75 80
 Arg Asp Tyr Gln Pro Ile Ser Ile Asn Tyr Arg Thr Glu Ile Asp Lys
 85 90 95
 Pro Ser Gln Ala His Lys Ser Glu Val Ala His Arg Phe Lys Asp Leu
 10 100 105 110
 Gly Glu Glu Asn Phe Lys Ala Leu Val Leu Ile Ala Phe Ala Gln Tyr
 115 120 125
 Leu Gln Gln Cys Pro Phe Glu Asp His Val Lys Leu Val Asn Glu Val
 130 135 140
 15 Thr Glu Phe Ala Lys Thr Cys Val Ala Asp Glu Ser Ala Glu Asn Cys
 145 150 155 160
 Asp Lys Ser Leu His Thr Leu Phe Gly Asp Lys Leu Cys Thr Val Ala
 165 170 175
 Thr Leu Arg Glu Thr Tyr Gly Glu Met Ala Asp Cys Cys Ala Lys Gln
 20 180 185 190
 Glu Pro Glu Arg Asn Glu Cys Phe Leu Gln His Lys Asp Asp Asn Pro
 195 200 205
 Asn Leu Pro Arg Leu Val Arg Pro Glu Val Asp Val Met Cys Thr Ala
 210 215 220
 25 Phe His Asp Asn Glu Glu Thr Phe Leu Lys Lys Tyr Leu Tyr Glu Ile
 225 230 235 240
 Ala Arg Arg His Pro Tyr Phe Tyr Ala Pro Glu Leu Leu Phe Phe Ala
 245 250 255
 Lys Arg Tyr Lys Ala Ala Phe Thr Glu Cys Cys Gln Ala Ala Asp Lys
 30 260 265 270
 Ala Ala Cys Leu Leu Pro Lys Leu Asp Glu Leu Arg Asp Glu Gly Lys
 275 280 285

Ala Ser Ser Ala Lys Gln Arg Leu Lys Cys Ala Ser Leu Gln Lys Phe
 290 295 300
 Gly Glu Arg Ala Phe Lys Ala Trp Ala Val Ala Arg Leu Ser Gln Arg
 305 310 315 320
 5 Phe Pro Lys Ala Glu Phe Ala Glu Val Ser Lys Leu Val Thr Asp Leu
 325 330 335
 Thr Lys Val His Thr Glu Cys Cys His Gly Asp Leu Leu Glu Cys Ala
 340 345 350
 Asp Asp Arg Ala Asp Leu Ala Lys Tyr Ile Cys Glu Asn Gln Asp Ser
 10 355 360 365
 Ile Ser Ser Lys Leu Lys Glu Cys Cys Glu Lys Pro Leu Leu Glu Lys
 370 375 380
 Ser His Cys Ile Ala Glu Val Glu Asn Asp Glu Met Pro Ala Asp Leu
 385 390 395 400
 15 Pro Ser Leu Ala Ala Asp Phe Val Glu Ser Lys Asp Val Cys Lys Asn
 405 410 415
 Tyr Ala Glu Ala Lys Asp Val Phe Leu Gly Met Phe Leu Tyr Glu Tyr
 420 425 430
 Ala Arg Arg His Pro Asp Tyr Ser Val Val Leu Leu Leu Arg Leu Ala
 20 435 440 445
 Lys Thr Tyr Glu Thr Thr Leu Glu Lys Cys Cys Ala Ala Ala Asp Pro
 450 455 460
 His Glu Cys Tyr Ala Lys Val Phe Asp Glu Phe Lys Pro Leu Val Glu
 465 470 475 480
 25 Glu Pro Gln Asn Leu Ile Lys Gln Asn Cys Glu Leu Phe Glu Gln Leu
 485 490 495
 Gly Glu Tyr Lys Phe Gln Asn Ala Leu Leu Val Arg Tyr Thr Lys Lys
 500 505 510
 Val Pro Gln Val Ser Thr Pro Thr Leu Val Glu Val Ser Arg Asn Leu
 30 515 520 525
 Gly Lys Val Gly Ser Lys Cys Cys Lys His Pro Glu Ala Lys Arg Met
 530 535 540

Pro Cys Ala Glu Asp Tyr Leu Ser Val Val Leu Asn Gln Leu Cys Val
 545 550 555 560
 Leu His Glu Lys Thr Pro Val Ser Asp Arg Val Thr Lys Cys Cys Thr
 565 570 575
 5 Glu Ser Leu Val Asn Arg Arg Pro Cys Phe Ser Ala Leu Glu Val Asp
 580 585 590
 Glu Thr Tyr Val Pro Lys Glu Phe Asn Ala Glu Thr Phe Thr Phe His
 595 600 605
 Ala Asp Ile Cys Thr Leu Ser Glu Lys Glu Arg Gln Ile Lys Lys Gln
 10 610 615 620
 Thr Ala Leu Val Glu Leu Val Lys His Lys Pro Lys Ala Thr Lys Glu
 625 630 635 640
 Gln Leu Lys Ala Val Met Asp Asp Phe Ala Ala Phe Val Glu Lys Cys
 645 650 655
 15 Cys Lys Ala Asp Asp Lys Glu Thr Cys Phe Ala Glu Glu Gly Lys Lys
 660 665 670
 Leu Val Ala Ala Ser Gln Ala Ala Leu Gly
 675 680
 <210> 234
 20 <211> 685
 <212> PRT
 <213> Sequência artificial
 <220>
 <223> Descrição de Sequência artificial: construto sintético
 25 <400> 234
 Met Gly Val Ser Asp Val Pro Arg Asp Leu Glu Val Val Ala Ala Thr
 1 5 10 15
 Pro Thr Ser Leu Leu Ile Ser Trp Ser Ala Arg Leu Lys Val Ala Arg
 20 25 30
 30 Tyr Tyr Arg Ile Thr Tyr Gly Glu Thr Gly Gly Asn Ser Pro Val Gln
 35 40 45
 Glu Phe Thr Val Pro Lys Asn Val Tyr Thr Ala Thr Ile Ser Gly Leu

	50		55		60											
	Lys	Pro	Gly	Val	Asp	Tyr	Thr	Ile	Thr	Val	Tyr	Ala	Val	Thr	Arg	Phe
	65				70					75					80	
	Arg	Asp	Tyr	Gln	Pro	Ile	Ser	Ile	Asn	Tyr	Arg	Thr	Gly	Ser	Gly	Ser
5				85					90					95		
	Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Ser	Ala	His	Lys	Ser	Glu	Val	Ala	His	Arg	Phe
			100						105					110		
	Lys	Asp	Leu	Gly	Glu	Glu	Asn	Phe	Lys	Ala	Leu	Val	Leu	Ile	Ala	Phe
			115					120						125		
10	Ala	Gln	Tyr	Leu	Gln	Gln	Cys	Pro	Phe	Glu	Asp	His	Val	Lys	Leu	Val
			130					135						140		
	Asn	Glu	Val	Thr	Glu	Phe	Ala	Lys	Thr	Cys	Val	Ala	Asp	Glu	Ser	Ala
	145				150					155				160		
	Glu	Asn	Cys	Asp	Lys	Ser	Leu	His	Thr	Leu	Phe	Gly	Asp	Lys	Leu	Cys
15				165					170					175		
	Thr	Val	Ala	Thr	Leu	Arg	Glu	Thr	Tyr	Gly	Glu	Met	Ala	Asp	Cys	Cys
			180						185					190		
	Ala	Lys	Gln	Glu	Pro	Glu	Arg	Asn	Glu	Cys	Phe	Leu	Gln	His	Lys	Asp
			195					200						205		
20	Asp	Asn	Pro	Asn	Leu	Pro	Arg	Leu	Val	Arg	Pro	Glu	Val	Asp	Val	Met
			210					215						220		
	Cys	Thr	Ala	Phe	His	Asp	Asn	Glu	Glu	Thr	Phe	Leu	Lys	Lys	Tyr	Leu
	225				230					235				240		
	Tyr	Glu	Ile	Ala	Arg	Arg	His	Pro	Tyr	Phe	Tyr	Ala	Pro	Glu	Leu	Leu
25				245					250					255		
	Phe	Phe	Ala	Lys	Arg	Tyr	Lys	Ala	Ala	Phe	Thr	Glu	Cys	Cys	Gln	Ala
			260						265					270		
	Ala	Asp	Lys	Ala	Ala	Cys	Leu	Leu	Pro	Lys	Leu	Asp	Glu	Leu	Arg	Asp
			275					280					285			
30	Glu	Gly	Lys	Ala	Ser	Ser	Ala	Lys	Gln	Arg	Leu	Lys	Cys	Ala	Ser	Leu
			290					295					300			
	Gln	Lys	Phe	Gly	Glu	Arg	Ala	Phe	Lys	Ala	Trp	Ala	Val	Ala	Arg	Leu

305 310 315 320
 Ser Gln Arg Phe Pro Lys Ala Glu Phe Ala Glu Val Ser Lys Leu Val
 325 330 335
 Thr Asp Leu Thr Lys Val His Thr Glu Cys Cys His Gly Asp Leu Leu
 5 340 345 350
 Glu Cys Ala Asp Asp Arg Ala Asp Leu Ala Lys Tyr Ile Cys Glu Asn
 355 360 365
 Gln Asp Ser Ile Ser Ser Lys Leu Lys Glu Cys Cys Glu Lys Pro Leu
 370 375 380
 10 Leu Glu Lys Ser His Cys Ile Ala Glu Val Glu Asn Asp Glu Met Pro
 385 390 395 400
 Ala Asp Leu Pro Ser Leu Ala Ala Asp Phe Val Glu Ser Lys Asp Val
 405 410 415
 Cys Lys Asn Tyr Ala Glu Ala Lys Asp Val Phe Leu Gly Met Phe Leu
 15 420 425 430
 Tyr Glu Tyr Ala Arg Arg His Pro Asp Tyr Ser Val Val Leu Leu Leu
 435 440 445
 Arg Leu Ala Lys Thr Tyr Glu Thr Thr Leu Glu Lys Cys Cys Ala Ala
 450 455 460
 20 Ala Asp Pro His Glu Cys Tyr Ala Lys Val Phe Asp Glu Phe Lys Pro
 465 470 475 480
 Leu Val Glu Glu Pro Gln Asn Leu Ile Lys Gln Asn Cys Glu Leu Phe
 485 490 495
 Glu Gln Leu Gly Glu Tyr Lys Phe Gln Asn Ala Leu Leu Val Arg Tyr
 25 500 505 510
 Thr Lys Lys Val Pro Gln Val Ser Thr Pro Thr Leu Val Glu Val Ser
 515 520 525
 Arg Asn Leu Gly Lys Val Gly Ser Lys Cys Cys Lys His Pro Glu Ala
 530 535 540
 30 Lys Arg Met Pro Cys Ala Glu Asp Tyr Leu Ser Val Val Leu Asn Gln
 545 550 555 560
 Leu Cys Val Leu His Glu Lys Thr Pro Val Ser Asp Arg Val Thr Lys

565 570 575
 Cys Cys Thr Glu Ser Leu Val Asn Arg Arg Pro Cys Phe Ser Ala Leu
 580 585 590
 Glu Val Asp Glu Thr Tyr Val Pro Lys Glu Phe Asn Ala Glu Thr Phe
 595 600 605
 Thr Phe His Ala Asp Ile Cys Thr Leu Ser Glu Lys Glu Arg Gln Ile
 610 615 620
 Lys Lys Gln Thr Ala Leu Val Glu Leu Val Lys His Lys Pro Lys Ala
 625 630 635 640
 10 Thr Lys Glu Gln Leu Lys Ala Val Met Asp Asp Phe Ala Ala Phe Val
 645 650 655
 Glu Lys Cys Cys Lys Ala Asp Asp Lys Glu Thr Cys Phe Ala Glu Glu
 660 665 670
 Gly Lys Lys Leu Val Ala Ala Ser Gln Ala Ala Leu Gly
 15 675 680 685
 <210> 235
 <211> 695
 <212> PRT
 <213> Sequência artificial
 20 <220>
 <223> Descrição de Sequência artificial: construto sintético
 <400> 235
 Met Gly Val Ser Asp Val Pro Arg Asp Leu Glu Val Val Ala Ala Thr
 1 5 10 15
 25 Pro Thr Ser Leu Leu Ile Ser Trp Ser Ala Arg Leu Lys Val Ala Arg
 20 25 30
 Tyr Tyr Arg Ile Thr Tyr Gly Glu Thr Gly Gly Asn Ser Pro Val Gln
 35 40 45
 Glu Phe Thr Val Pro Lys Asn Val Tyr Thr Ala Thr Ile Ser Gly Leu
 30 50 55 60
 Lys Pro Gly Val Asp Tyr Thr Ile Thr Val Tyr Ala Val Thr Arg Phe
 65 70 75 80

	Arg	Asp	Tyr	Gln	Pro	Ile	Ser	Ile	Asn	Tyr	Arg	Thr	Gly	Ser	Gly	Ser
						85					90					95
	Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Ser
					100					105					110	
5	Ala	His	Lys	Ser	Glu	Val	Ala	His	Arg	Phe	Lys	Asp	Leu	Gly	Glu	Glu
					115				120				125			
	Asn	Phe	Lys	Ala	Leu	Val	Leu	Ile	Ala	Phe	Ala	Gln	Tyr	Leu	Gln	Gln
					130			135				140				
	Cys	Pro	Phe	Glu	Asp	His	Val	Lys	Leu	Val	Asn	Glu	Val	Thr	Glu	Phe
10	145					150					155					160
	Ala	Lys	Thr	Cys	Val	Ala	Asp	Glu	Ser	Ala	Glu	Asn	Cys	Asp	Lys	Ser
					165					170					175	
	Leu	His	Thr	Leu	Phe	Gly	Asp	Lys	Leu	Cys	Thr	Val	Ala	Thr	Leu	Arg
					180				185				190			
15	Glu	Thr	Tyr	Gly	Glu	Met	Ala	Asp	Cys	Cys	Ala	Lys	Gln	Glu	Pro	Glu
					195			200				205				
	Arg	Asn	Glu	Cys	Phe	Leu	Gln	His	Lys	Asp	Asp	Asn	Pro	Asn	Leu	Pro
					210			215				220				
	Arg	Leu	Val	Arg	Pro	Glu	Val	Asp	Val	Met	Cys	Thr	Ala	Phe	His	Asp
20	225					230					235					240
	Asn	Glu	Glu	Thr	Phe	Leu	Lys	Lys	Tyr	Leu	Tyr	Glu	Ile	Ala	Arg	Arg
					245					250					255	
	His	Pro	Tyr	Phe	Tyr	Ala	Pro	Glu	Leu	Leu	Phe	Phe	Ala	Lys	Arg	Tyr
					260				265				270			
25	Lys	Ala	Ala	Phe	Thr	Glu	Cys	Cys	Gln	Ala	Ala	Asp	Lys	Ala	Ala	Cys
					275				280				285			
	Leu	Leu	Pro	Lys	Leu	Asp	Glu	Leu	Arg	Asp	Glu	Gly	Lys	Ala	Ser	Ser
					290			295				300				
	Ala	Lys	Gln	Arg	Leu	Lys	Cys	Ala	Ser	Leu	Gln	Lys	Phe	Gly	Glu	Arg
30	305					310					315					320
	Ala	Phe	Lys	Ala	Trp	Ala	Val	Ala	Arg	Leu	Ser	Gln	Arg	Phe	Pro	Lys
					325					330					335	

Ala Glu Phe Ala Glu Val Ser Lys Leu Val Thr Asp Leu Thr Lys Val
340 345 350

His Thr Glu Cys Cys His Gly Asp Leu Leu Glu Cys Ala Asp Asp Arg
355 360 365

5 Ala Asp Leu Ala Lys Tyr Ile Cys Glu Asn Gln Asp Ser Ile Ser Ser
370 375 380

Lys Leu Lys Glu Cys Cys Glu Lys Pro Leu Leu Glu Lys Ser His Cys
385 390 395 400

Ile Ala Glu Val Glu Asn Asp Glu Met Pro Ala Asp Leu Pro Ser Leu
10 405 410 415

Ala Ala Asp Phe Val Glu Ser Lys Asp Val Cys Lys Asn Tyr Ala Glu
420 425 430

Ala Lys Asp Val Phe Leu Gly Met Phe Leu Tyr Glu Tyr Ala Arg Arg
435 440 445

15 His Pro Asp Tyr Ser Val Val Leu Leu Leu Arg Leu Ala Lys Thr Tyr
450 455 460

Glu Thr Thr Leu Glu Lys Cys Cys Ala Ala Ala Asp Pro His Glu Cys
465 470 475 480

Tyr Ala Lys Val Phe Asp Glu Phe Lys Pro Leu Val Glu Glu Pro Gln
20 485 490 495

Asn Leu Ile Lys Gln Asn Cys Glu Leu Phe Glu Gln Leu Gly Glu Tyr
500 505 510

Lys Phe Gln Asn Ala Leu Leu Val Arg Tyr Thr Lys Lys Val Pro Gln
515 520 525

25 Val Ser Thr Pro Thr Leu Val Glu Val Ser Arg Asn Leu Gly Lys Val
530 535 540

Gly Ser Lys Cys Cys Lys His Pro Glu Ala Lys Arg Met Pro Cys Ala
545 550 555 560

Glu Asp Tyr Leu Ser Val Val Leu Asn Gln Leu Cys Val Leu His Glu
30 565 570 575

Lys Thr Pro Val Ser Asp Arg Val Thr Lys Cys Cys Thr Glu Ser Leu
580 585 590

Val Asn Arg Arg Pro Cys Phe Ser Ala Leu Glu Val Asp Glu Thr Tyr
595 600 605

Val Pro Lys Glu Phe Asn Ala Glu Thr Phe Thr Phe His Ala Asp Ile
610 615 620

5 Cys Thr Leu Ser Glu Lys Glu Arg Gln Ile Lys Lys Gln Thr Ala Leu
625 630 635 640

Val Glu Leu Val Lys His Lys Pro Lys Ala Thr Lys Glu Gln Leu Lys
645 650 655

Ala Val Met Asp Asp Phe Ala Ala Phe Val Glu Lys Cys Cys Lys Ala
10 660 665 670

Asp Asp Lys Glu Thr Cys Phe Ala Glu Glu Gly Lys Lys Leu Val Ala
675 680 685

Ala Ser Gln Ala Ala Leu Gly
690 695

15 <210> 236
<211> 796
<212> PRT
<213> Sequência artificial
<220>

20 <223> Descrição de Sequência artificial: construto sintético
<400> 236

Met Arg Leu Ala Val Gly Ala Leu Leu Val Cys Ala Val Leu Gly Leu
1 5 10 15

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

His Glu Ala Thr Lys Cys Gln Ser Phe Arg Asp His Met Lys Ser Val
35 40 45

Ile Pro Ser Asp Gly Pro Ser Val Ala Cys Val Lys Lys Ala Ser Tyr
50 55 60

30 Leu Asp Cys Ile Arg Ala Ile Ala Ala Asn Glu Ala Asp Ala Val Thr
65 70 75 80

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

		85		90		95											
		Lys	Pro	Val	Val	Ala	Glu	Phe	Tyr	Gly	Ser	Lys	Glu	Asp	Pro	Gln	Thr
				100						105						110	
		Phe	Tyr	Tyr	Ala	Val	Ala	Val	Val	Lys	Lys	Asp	Ser	Gly	Phe	Gln	Met
5				115						120						125	
		Asn	Gln	Leu	Arg	Gly	Lys	Lys	Ser	Cys	His	Thr	Gly	Leu	Gly	Arg	Ser
				130						135						140	
		Ala	Gly	Trp	Asn	Ile	Pro	Ile	Gly	Leu	Leu	Tyr	Cys	Asp	Leu	Pro	Glu
		145				150						155				160	
10		Pro	Arg	Lys	Pro	Leu	Glu	Lys	Ala	Val	Ala	Asn	Phe	Phe	Ser	Gly	Ser
						165						170				175	
		Cys	Ala	Pro	Cys	Ala	Asp	Gly	Thr	Asp	Phe	Pro	Gln	Leu	Cys	Gln	Leu
						180						185				190	
		Cys	Pro	Gly	Cys	Gly	Cys	Ser	Thr	Leu	Asn	Gln	Tyr	Phe	Gly	Tyr	Ser
15				195						200						205	
		Gly	Ala	Phe	Lys	Cys	Leu	Lys	Asp	Gly	Ala	Gly	Asp	Val	Ala	Phe	Val
				210						215						220	
		Lys	His	Ser	Thr	Ile	Phe	Glu	Asn	Leu	Ala	Asn	Lys	Ala	Asp	Arg	Asp
		225				230						235				240	
20		Gln	Tyr	Glu	Leu	Leu	Cys	Leu	Asp	Asn	Thr	Arg	Lys	Pro	Val	Asp	Glu
						245						250				255	
		Tyr	Lys	Asp	Cys	His	Leu	Ala	Gln	Val	Pro	Ser	His	Thr	Val	Val	Ala
						260						265				270	
		Arg	Ser	Met	Gly	Gly	Lys	Glu	Asp	Leu	Ile	Trp	Glu	Leu	Leu	Asn	Gln
25				275						280						285	
		Ala	Gln	Glu	His	Phe	Gly	Lys	Asp	Lys	Ser	Lys	Glu	Phe	Gln	Leu	Phe
				290						295						300	
		Ser	Ser	Pro	His	Gly	Lys	Asp	Leu	Leu	Phe	Lys	Asp	Ser	Ala	His	Gly
		305				310						315				320	
30		Phe	Leu	Lys	Val	Pro	Pro	Arg	Met	Asp	Ala	Lys	Met	Tyr	Leu	Gly	Tyr
						325						330				335	
		Glu	Tyr	Val	Thr	Ala	Ile	Arg	Asn	Leu	Arg	Glu	Gly	Thr	Cys	Pro	Glu

	340	345	350
	Ala Pro Thr Asp Glu Cys Lys Pro Val Lys Trp Cys Ala Leu Ser His		
	355	360	365
	His Glu Arg Leu Lys Cys Asp Glu Trp Ser Val Asn Ser Val Gly Lys		
5	370	375	380
	Ile Glu Cys Val Ser Ala Glu Thr Thr Glu Asp Cys Ile Ala Lys Ile		
	385	390	395 400
	Met Asn Gly Glu Ala Asp Ala Met Ser Leu Asp Gly Gly Phe Val Tyr		
	405	410	415
10	Ile Ala Gly Lys Cys Gly Leu Val Pro Val Leu Ala Glu Asn Tyr Asn		
	420	425	430
	Lys Ser Asp Asn Cys Glu Asp Thr Pro Glu Ala Gly Tyr Phe Ala Val		
	435	440	445
	Ala Val Val Lys Lys Ser Ala Ser Asp Leu Thr Trp Asp Asn Leu Lys		
15	450	455	460
	Gly Lys Lys Ser Cys His Thr Ala Val Gly Arg Thr Ala Gly Trp Asn		
	465	470	475 480
	Ile Pro Met Gly Leu Leu Tyr Asn Lys Ile Asn His Cys Arg Phe Asp		
	485	490	495
20	Glu Phe Phe Ser Glu Gly Cys Ala Pro Gly Ser Lys Lys Asp Ser Ser		
	500	505	510
	Leu Cys Lys Leu Cys Met Gly Ser Gly Leu Asn Leu Cys Glu Pro Asn		
	515	520	525
	Asn Lys Glu Gly Tyr Tyr Gly Tyr Thr Gly Ala Phe Arg Cys Leu Val		
25	530	535	540
	Glu Lys Gly Asp Val Ala Phe Val Lys His Gln Thr Val Pro Gln Asn		
	545	550	555 560
	Thr Gly Gly Lys Asn Pro Asp Pro Trp Ala Lys Asn Leu Asn Glu Lys		
	565	570	575
30	Asp Tyr Glu Leu Leu Cys Leu Asp Gly Thr Arg Lys Pro Val Glu Glu		
	580	585	590
	Tyr Ala Asn Cys His Leu Ala Arg Ala Pro Asn His Ala Val Val Thr		

	595	600	605
	Arg Lys Asp Lys Glu Ala Cys Val His Lys Ile Leu Arg Gln Gln Gln		
	610	615	620
	His Leu Phe Gly Ser Asn Val Thr Asp Cys Ser Gly Asn Phe Cys Leu		
5	625	630	635 640
	Phe Arg Ser Glu Thr Lys Asp Leu Leu Phe Arg Asp Asp Thr Val Cys		
	645	650	655
	Leu Ala Lys Leu His Asp Arg Asn Thr Tyr Glu Lys Tyr Leu Gly Glu		
	660	665	670
10	Glu Tyr Val Lys Ala Val Gly Asn Leu Arg Lys Cys Ser Thr Ser Ser		
	675	680	685
	Leu Leu Glu Ala Cys Thr Phe Arg Arg Pro Pro Ser Thr Ser Thr Ser		
	690	695	700
	Thr Gly Val Ser Asp Val Pro Arg Asp Leu Glu Val Val Ala Ala Thr		
15	705	710	715 720
	Pro Thr Ser Leu Leu Ile Ser Trp Ser Ala Arg Leu Lys Val Ala Arg		
	725	730	735
	Tyr Tyr Arg Ile Thr Tyr Gly Glu Thr Gly Gly Asn Ser Pro Val Gln		
	740	745	750
20	Glu Phe Thr Val Pro Lys Asn Val Tyr Thr Ala Thr Ile Ser Gly Leu		
	755	760	765
	Lys Pro Gly Val Asp Tyr Thr Ile Thr Val Tyr Ala Val Thr Arg Phe		
	770	775	780
	Arg Asp Tyr Gln Pro Ile Ser Ile Asn Tyr Arg Thr		
25	785	790	795
	<210> 237		
	<211> 778		
	<212> PRT		
	<213> Sequência artificial		
30	<220>		
	<223> Descrição de Sequência artificial: construto sintético		
	<400> 237		

Met Gly Val Ser Asp Val Pro Arg Asp Leu Glu Val Val Ala Ala Thr
 1 5 10 15
 Pro Thr Ser Leu Leu Ile Ser Trp Ser Ala Arg Leu Lys Val Ala Arg
 20 25 30
 5 Tyr Tyr Arg Ile Thr Tyr Gly Glu Thr Gly Gly Asn Ser Pro Val Gln
 35 40 45
 Glu Phe Thr Val Pro Lys Asn Val Tyr Thr Ala Thr Ile Ser Gly Leu
 50 55 60
 Lys Pro Gly Val Asp Tyr Thr Ile Thr Val Tyr Ala Val Thr Arg Phe
 10 65 70 75 80
 Arg Asp Tyr Gln Pro Ile Ser Ile Asn Tyr Arg Thr Pro Ser Thr Ser
 85 90 95
 Thr Ser Thr Val Pro Asp Lys Thr Val Arg Trp Cys Ala Val Ser Glu
 100 105 110
 15 His Glu Ala Thr Lys Cys Gln Ser Phe Arg Asp His Met Lys Ser Val
 115 120 125
 Ile Pro Ser Asp Gly Pro Ser Val Ala Cys Val Lys Lys Ala Ser Tyr
 130 135 140
 Leu Asp Cys Ile Arg Ala Ile Ala Ala Asn Glu Ala Asp Ala Val Thr
 145 150 155 160
 20 Leu Asp Ala Gly Leu Val Tyr Asp Ala Tyr Leu Ala Pro Asn Asn Leu
 165 170 175
 Lys Pro Val Val Ala Glu Phe Tyr Gly Ser Lys Glu Asp Pro Gln Thr
 180 185 190
 25 Phe Tyr Tyr Ala Val Ala Val Val Lys Lys Asp Ser Gly Phe Gln Met
 195 200 205
 Asn Gln Leu Arg Gly Lys Lys Ser Cys His Thr Gly Leu Gly Arg Ser
 210 215 220
 Ala Gly Trp Asn Ile Pro Ile Gly Leu Leu Tyr Cys Asp Leu Pro Glu
 225 230 235 240
 30 Pro Arg Lys Pro Leu Glu Lys Ala Val Ala Asn Phe Phe Ser Gly Ser
 245 250 255

Cys Ala Pro Cys Ala Asp Gly Thr Asp Phe Pro Gln Leu Cys Gln Leu
 260 265 270
 Cys Pro Gly Cys Gly Cys Ser Thr Leu Asn Gln Tyr Phe Gly Tyr Ser
 275 280 285
 5 Gly Ala Phe Lys Cys Leu Lys Asp Gly Ala Gly Asp Val Ala Phe Val
 290 295 300
 Lys His Ser Thr Ile Phe Glu Asn Leu Ala Asn Lys Ala Asp Arg Asp
 305 310 315 320
 Gln Tyr Glu Leu Leu Cys Leu Asp Asn Thr Arg Lys Pro Val Asp Glu
 10 325 330 335
 Tyr Lys Asp Cys His Leu Ala Gln Val Pro Ser His Thr Val Val Ala
 340 345 350
 Arg Ser Met Gly Gly Lys Glu Asp Leu Ile Trp Glu Leu Leu Asn Gln
 355 360 365
 15 Ala Gln Glu His Phe Gly Lys Asp Lys Ser Lys Glu Phe Gln Leu Phe
 370 375 380
 Ser Ser Pro His Gly Lys Asp Leu Leu Phe Lys Asp Ser Ala His Gly
 385 390 395 400
 Phe Leu Lys Val Pro Pro Arg Met Asp Ala Lys Met Tyr Leu Gly Tyr
 20 405 410 415
 Glu Tyr Val Thr Ala Ile Arg Asn Leu Arg Glu Gly Thr Cys Pro Glu
 420 425 430
 Ala Pro Thr Asp Glu Cys Lys Pro Val Lys Trp Cys Ala Leu Ser His
 435 440 445
 25 His Glu Arg Leu Lys Cys Asp Glu Trp Ser Val Asn Ser Val Gly Lys
 450 455 460
 Ile Glu Cys Val Ser Ala Glu Thr Thr Glu Asp Cys Ile Ala Lys Ile
 465 470 475 480
 Met Asn Gly Glu Ala Asp Ala Met Ser Leu Asp Gly Gly Phe Val Tyr
 30 485 490 495
 Ile Ala Gly Lys Cys Gly Leu Val Pro Val Leu Ala Glu Asn Tyr Asn
 500 505 510

Lys Ser Asp Asn Cys Glu Asp Thr Pro Glu Ala Gly Tyr Phe Ala Val
 515 520 525
 Ala Val Val Lys Lys Ser Ala Ser Asp Leu Thr Trp Asp Asn Leu Lys
 530 535 540
 5 Gly Lys Lys Ser Cys His Thr Ala Val Gly Arg Thr Ala Gly Trp Asn
 545 550 555 560
 Ile Pro Met Gly Leu Leu Tyr Asn Lys Ile Asn His Cys Arg Phe Asp
 565 570 575
 Glu Phe Phe Ser Glu Gly Cys Ala Pro Gly Ser Lys Lys Asp Ser Ser
 10 580 585 590
 Leu Cys Lys Leu Cys Met Gly Ser Gly Leu Asn Leu Cys Glu Pro Asn
 595 600 605
 Asn Lys Glu Gly Tyr Tyr Gly Tyr Thr Gly Ala Phe Arg Cys Leu Val
 610 615 620
 15 Glu Lys Gly Asp Val Ala Phe Val Lys His Gln Thr Val Pro Gln Asn
 625 630 635 640
 Thr Gly Gly Lys Asn Pro Asp Pro Trp Ala Lys Asn Leu Asn Glu Lys
 645 650 655
 Asp Tyr Glu Leu Leu Cys Leu Asp Gly Thr Arg Lys Pro Val Glu Glu
 20 660 665 670
 Tyr Ala Asn Cys His Leu Ala Arg Ala Pro Asn His Ala Val Val Thr
 675 680 685
 Arg Lys Asp Lys Glu Ala Cys Val His Lys Ile Leu Arg Gln Gln Gln
 690 695 700
 25 His Leu Phe Gly Ser Asn Val Thr Asp Cys Ser Gly Asn Phe Cys Leu
 705 710 715 720
 Phe Arg Ser Glu Thr Lys Asp Leu Leu Phe Arg Asp Asp Thr Val Cys
 725 730 735
 Leu Ala Lys Leu His Asp Arg Asn Thr Tyr Glu Lys Tyr Leu Gly Glu
 30 740 745 750
 Glu Tyr Val Lys Ala Val Gly Asn Leu Arg Lys Cys Ser Thr Ser Ser
 755 760 765

Leu Leu Glu Ala Cys Thr Phe Arg Arg Pro
 770 775
 <210> 238
 <211> 796
 5 <212> PRT
 <213> Sequência artificial
 <220>
 <223> Descrição de Sequência artificial: construto sintético
 <400> 238
 10 Met Arg Leu Ala Val Gly Ala Leu Leu Val Cys Ala Val Leu Gly Leu
 1 5 10 15
 Cys Leu Ala Val Pro Asp Lys Thr Val Arg Trp Cys Ala Val Ser Glu
 20 25 30
 His Glu Ala Thr Lys Cys Gln Ser Phe Arg Asp His Met Lys Ser Val
 15 35 40 45
 Ile Pro Ser Asp Gly Pro Ser Val Ala Cys Val Lys Lys Ala Ser Tyr
 50 55 60
 Leu Asp Cys Ile Arg Ala Ile Ala Ala Asn Glu Ala Asp Ala Val Thr
 65 70 75 80
 20 Leu Asp Ala Gly Leu Val Tyr Asp Ala Tyr Leu Ala Pro Asn Asn Leu
 85 90 95
 Lys Pro Val Val Ala Glu Phe Tyr Gly Ser Lys Glu Asp Pro Gln Thr
 100 105 110
 Phe Tyr Tyr Ala Val Ala Val Val Lys Lys Asp Ser Gly Phe Gln Met
 25 115 120 125
 Asn Gln Leu Arg Gly Lys Lys Ser Cys His Thr Gly Leu Gly Arg Ser
 130 135 140
 Ala Gly Trp Asn Ile Pro Ile Gly Leu Leu Tyr Cys Asp Leu Pro Glu
 145 150 155 160
 30 Pro Arg Lys Pro Leu Glu Lys Ala Val Ala Asn Phe Phe Ser Gly Ser
 165 170 175
 Cys Ala Pro Cys Ala Asp Gly Thr Asp Phe Pro Gln Leu Cys Gln Leu

	180	185	190
	Cys Pro Gly Cys Gly Cys Ser Thr Leu Asn Gln Tyr Phe Gly Tyr Ser		
	195	200	205
	Gly Ala Phe Lys Cys Leu Lys Asp Gly Ala Gly Asp Val Ala Phe Val		
5	210	215	220
	Lys His Ser Thr Ile Phe Glu Asn Leu Ala Asn Lys Ala Asp Arg Asp		
	225	230	235 240
	Gln Tyr Glu Leu Leu Cys Leu Asp Asn Thr Arg Lys Pro Val Asp Glu		
	245	250	255
10	Tyr Lys Asp Cys His Leu Ala Gln Val Pro Ser His Thr Val Val Ala		
	260	265	270
	Arg Ser Met Gly Gly Lys Glu Asp Leu Ile Trp Glu Leu Leu Asn Gln		
	275	280	285
	Ala Gln Glu His Phe Gly Lys Asp Lys Ser Lys Glu Phe Gln Leu Phe		
15	290	295	300
	Ser Ser Pro His Gly Lys Asp Leu Leu Phe Lys Asp Ser Ala His Gly		
	305	310	315 320
	Phe Leu Lys Val Pro Pro Arg Met Asp Ala Lys Met Tyr Leu Gly Tyr		
	325	330	335
20	Glu Tyr Val Thr Ala Ile Arg Asn Leu Arg Glu Gly Thr Cys Pro Glu		
	340	345	350
	Ala Pro Thr Asp Glu Cys Lys Pro Val Lys Trp Cys Ala Leu Ser His		
	355	360	365
	His Glu Arg Leu Lys Cys Asp Glu Trp Ser Val Asn Ser Val Gly Lys		
25	370	375	380
	Ile Glu Cys Val Ser Ala Glu Thr Thr Glu Asp Cys Ile Ala Lys Ile		
	385	390	395 400
	Met Asn Gly Glu Ala Asp Ala Met Ser Leu Asp Gly Gly Phe Val Tyr		
	405	410	415
30	Ile Ala Gly Lys Cys Gly Leu Val Pro Val Leu Ala Glu Asn Tyr Asn		
	420	425	430
	Lys Ser Asp Asn Cys Glu Asp Thr Pro Glu Ala Gly Tyr Phe Ala Val		

	435	440	445
	Ala Val Val Lys Lys Ser Ala Ser Asp Leu Thr Trp Asp Asn Leu Lys		
	450	455	460
	Gly Lys Lys Ser Cys His Thr Ala Val Gly Arg Thr Ala Gly Trp Asn		
5	465	470	475
	Ile Pro Met Gly Leu Leu Tyr Asn Lys Ile Asn His Cys Arg Phe Asp		480
	485	490	495
	Glu Phe Phe Ser Glu Gly Cys Ala Pro Gly Ser Lys Lys Asp Ser Ser		
	500	505	510
10	Leu Cys Lys Leu Cys Met Gly Ser Gly Leu Asn Leu Cys Glu Pro Asn		
	515	520	525
	Asn Lys Glu Gly Tyr Tyr Gly Tyr Thr Gly Ala Phe Arg Cys Leu Val		
	530	535	540
	Glu Lys Gly Asp Val Ala Phe Val Lys His Gln Thr Val Pro Gln Asn		
15	545	550	555
	Thr Gly Gly Lys Asn Pro Asp Pro Trp Ala Lys Asn Leu Asn Glu Lys		560
	565	570	575
	Asp Tyr Glu Leu Leu Cys Leu Asp Gly Thr Arg Lys Pro Val Glu Glu		
	580	585	590
20	Tyr Ala Asn Cys His Leu Ala Arg Ala Pro Asn His Ala Val Val Thr		
	595	600	605
	Arg Lys Asp Lys Glu Ala Cys Val His Lys Ile Leu Arg Gln Gln Gln		
	610	615	620
	His Leu Phe Gly Ser Asn Val Thr Asp Cys Ser Gly Asn Phe Cys Leu		
25	625	630	635
	Phe Arg Ser Glu Thr Lys Asp Leu Leu Phe Arg Asp Asp Thr Val Cys		640
	645	650	655
	Leu Ala Lys Leu His Asp Arg Asn Thr Tyr Glu Lys Tyr Leu Gly Glu		
	660	665	670
30	Glu Tyr Val Lys Ala Val Gly Asn Leu Arg Lys Cys Ser Thr Ser Ser		
	675	680	685
	Leu Leu Glu Ala Cys Thr Phe Arg Arg Pro Glu Ile Asp Lys Pro Ser		

	690	695	700
	Gln Gly Val Ser Asp Val Pro Arg Asp Leu Glu Val Val Ala Ala Thr		
	705	710	715 720
	Pro Thr Ser Leu Leu Ile Ser Trp Ser Ala Arg Leu Lys Val Ala Arg		
5	725	730	735
	Tyr Tyr Arg Ile Thr Tyr Gly Glu Thr Gly Gly Asn Ser Pro Val Gln		
	740	745	750
	Glu Phe Thr Val Pro Lys Asn Val Tyr Thr Ala Thr Ile Ser Gly Leu		
	755	760	765
10	Lys Pro Gly Val Asp Tyr Thr Ile Thr Val Tyr Ala Val Thr Arg Phe		
	770	775	780
	Arg Asp Tyr Gln Pro Ile Ser Ile Asn Tyr Arg Thr		
	785	790	795
	<210> 239		
15	<211> 799		
	<212> PRT		
	<213> Sequência artificial		
	<220>		
	<223> Descrição de Sequência artificial: construto sintético		
20	<400> 239		
	Met Arg Leu Ala Val Gly Ala Leu Leu Val Cys Ala Val Leu Gly Leu		
	1 5 10 15		
	Cys Leu Ala Val Pro Asp Lys Thr Val Arg Trp Cys Ala Val Ser Glu		
	20 25 30		
25	His Glu Ala Thr Lys Cys Gln Ser Phe Arg Asp His Met Lys Ser Val		
	35 40 45		
	Ile Pro Ser Asp Gly Pro Ser Val Ala Cys Val Lys Lys Ala Ser Tyr		
	50 55 60		
	Leu Asp Cys Ile Arg Ala Ile Ala Ala Asn Glu Ala Asp Ala Val Thr		
30	65 70 75 80		
	Leu Asp Ala Gly Leu Val Tyr Asp Ala Tyr Leu Ala Pro Asn Asn Leu		
	85 90 95		

Lys Pro Val Val Ala Glu Phe Tyr Gly Ser Lys Glu Asp Pro Gln Thr
 100 105 110
 Phe Tyr Tyr Ala Val Ala Val Val Lys Lys Asp Ser Gly Phe Gln Met
 115 120 125
 5 Asn Gln Leu Arg Gly Lys Lys Ser Cys His Thr Gly Leu Gly Arg Ser
 130 135 140
 Ala Gly Trp Asn Ile Pro Ile Gly Leu Leu Tyr Cys Asp Leu Pro Glu
 145 150 155 160
 Pro Arg Lys Pro Leu Glu Lys Ala Val Ala Asn Phe Phe Ser Gly Ser
 10 165 170 175
 Cys Ala Pro Cys Ala Asp Gly Thr Asp Phe Pro Gln Leu Cys Gln Leu
 180 185 190
 Cys Pro Gly Cys Gly Cys Ser Thr Leu Asn Gln Tyr Phe Gly Tyr Ser
 195 200 205
 15 Gly Ala Phe Lys Cys Leu Lys Asp Gly Ala Gly Asp Val Ala Phe Val
 210 215 220
 Lys His Ser Thr Ile Phe Glu Asn Leu Ala Asn Lys Ala Asp Arg Asp
 225 230 235 240
 Gln Tyr Glu Leu Leu Cys Leu Asp Asn Thr Arg Lys Pro Val Asp Glu
 20 245 250 255
 Tyr Lys Asp Cys His Leu Ala Gln Val Pro Ser His Thr Val Val Ala
 260 265 270
 Arg Ser Met Gly Gly Lys Glu Asp Leu Ile Trp Glu Leu Leu Asn Gln
 275 280 285
 25 Ala Gln Glu His Phe Gly Lys Asp Lys Ser Lys Glu Phe Gln Leu Phe
 290 295 300
 Ser Ser Pro His Gly Lys Asp Leu Leu Phe Lys Asp Ser Ala His Gly
 305 310 315 320
 Phe Leu Lys Val Pro Pro Arg Met Asp Ala Lys Met Tyr Leu Gly Tyr
 30 325 330 335
 Glu Tyr Val Thr Ala Ile Arg Asn Leu Arg Glu Gly Thr Cys Pro Glu
 340 345 350

Ala Pro Thr Asp Glu Cys Lys Pro Val Lys Trp Cys Ala Leu Ser His
 355 360 365
 His Glu Arg Leu Lys Cys Asp Glu Trp Ser Val Asn Ser Val Gly Lys
 370 375 380
 5 Ile Glu Cys Val Ser Ala Glu Thr Thr Glu Asp Cys Ile Ala Lys Ile
 385 390 395 400
 Met Asn Gly Glu Ala Asp Ala Met Ser Leu Asp Gly Gly Phe Val Tyr
 405 410 415
 Ile Ala Gly Lys Cys Gly Leu Val Pro Val Leu Ala Glu Asn Tyr Asn
 10 420 425 430
 Lys Ser Asp Asn Cys Glu Asp Thr Pro Glu Ala Gly Tyr Phe Ala Val
 435 440 445
 Ala Val Val Lys Lys Ser Ala Ser Asp Leu Thr Trp Asp Asn Leu Lys
 450 455 460
 15 Gly Lys Lys Ser Cys His Thr Ala Val Gly Arg Thr Ala Gly Trp Asn
 465 470 475 480
 Ile Pro Met Gly Leu Leu Tyr Asn Lys Ile Asn His Cys Arg Phe Asp
 485 490 495
 Glu Phe Phe Ser Glu Gly Cys Ala Pro Gly Ser Lys Lys Asp Ser Ser
 20 500 505 510
 Leu Cys Lys Leu Cys Met Gly Ser Gly Leu Asn Leu Cys Glu Pro Asn
 515 520 525
 Asn Lys Glu Gly Tyr Tyr Gly Tyr Thr Gly Ala Phe Arg Cys Leu Val
 530 535 540
 25 Glu Lys Gly Asp Val Ala Phe Val Lys His Gln Thr Val Pro Gln Asn
 545 550 555 560
 Thr Gly Gly Lys Asn Pro Asp Pro Trp Ala Lys Asn Leu Asn Glu Lys
 565 570 575
 Asp Tyr Glu Leu Leu Cys Leu Asp Gly Thr Arg Lys Pro Val Glu Glu
 30 580 585 590
 Tyr Ala Asn Cys His Leu Ala Arg Ala Pro Asn His Ala Val Val Thr
 595 600 605

Arg Lys Asp Lys Glu Ala Cys Val His Lys Ile Leu Arg Gln Gln Gln
 610 615 620
 His Leu Phe Gly Ser Asn Val Thr Asp Cys Ser Gly Asn Phe Cys Leu
 625 630 635 640
 5 Phe Arg Ser Glu Thr Lys Asp Leu Leu Phe Arg Asp Asp Thr Val Cys
 645 650 655
 Leu Ala Lys Leu His Asp Arg Asn Thr Tyr Glu Lys Tyr Leu Gly Glu
 660 665 670
 Glu Tyr Val Lys Ala Val Gly Asn Leu Arg Lys Cys Ser Thr Ser Ser
 10 675 680 685
 Leu Leu Glu Ala Cys Thr Phe Arg Arg Pro Gly Ser Gly Ser Gly Ser
 690 695 700
 Gly Ser Gly Ser Gly Val Ser Asp Val Pro Arg Asp Leu Glu Val Val
 705 710 715 720
 15 Ala Ala Thr Pro Thr Ser Leu Leu Ile Ser Trp Ser Ala Arg Leu Lys
 725 730 735
 Val Ala Arg Tyr Tyr Arg Ile Thr Tyr Gly Glu Thr Gly Gly Asn Ser
 740 745 750
 Pro Val Gln Glu Phe Thr Val Pro Lys Asn Val Tyr Thr Ala Thr Ile
 20 755 760 765
 Ser Gly Leu Lys Pro Gly Val Asp Tyr Thr Ile Thr Val Tyr Ala Val
 770 775 780
 Thr Arg Phe Arg Asp Tyr Gln Pro Ile Ser Ile Asn Tyr Arg Thr
 785 790 795
 25 <210> 240
 <211> 809
 <212> PRT
 <213> Sequência artificial
 <220>
 30 <223> Descrição de Sequência artificial: construto sintético
 <400> 240
 Met Arg Leu Ala Val Gly Ala Leu Leu Val Cys Ala Val Leu Gly Leu

1 5 10 15
 Cys Leu Ala Val Pro Asp Lys Thr Val Arg Trp Cys Ala Val Ser Glu
 20 25 30
 His Glu Ala Thr Lys Cys Gln Ser Phe Arg Asp His Met Lys Ser Val
 5 35 40 45
 Ile Pro Ser Asp Gly Pro Ser Val Ala Cys Val Lys Lys Ala Ser Tyr
 50 55 60
 Leu Asp Cys Ile Arg Ala Ile Ala Ala Asn Glu Ala Asp Ala Val Thr
 65 70 75 80
 10 Leu Asp Ala Gly Leu Val Tyr Asp Ala Tyr Leu Ala Pro Asn Asn Leu
 85 90 95
 Lys Pro Val Val Ala Glu Phe Tyr Gly Ser Lys Glu Asp Pro Gln Thr
 100 105 110
 Phe Tyr Tyr Ala Val Ala Val Val Lys Lys Asp Ser Gly Phe Gln Met
 15 115 120 125
 Asn Gln Leu Arg Gly Lys Lys Ser Cys His Thr Gly Leu Gly Arg Ser
 130 135 140
 Ala Gly Trp Asn Ile Pro Ile Gly Leu Leu Tyr Cys Asp Leu Pro Glu
 145 150 155 160
 20 Pro Arg Lys Pro Leu Glu Lys Ala Val Ala Asn Phe Phe Ser Gly Ser
 165 170 175
 Cys Ala Pro Cys Ala Asp Gly Thr Asp Phe Pro Gln Leu Cys Gln Leu
 180 185 190
 Cys Pro Gly Cys Gly Cys Ser Thr Leu Asn Gln Tyr Phe Gly Tyr Ser
 25 195 200 205
 Gly Ala Phe Lys Cys Leu Lys Asp Gly Ala Gly Asp Val Ala Phe Val
 210 215 220
 Lys His Ser Thr Ile Phe Glu Asn Leu Ala Asn Lys Ala Asp Arg Asp
 225 230 235 240
 30 Gln Tyr Glu Leu Leu Cys Leu Asp Asn Thr Arg Lys Pro Val Asp Glu
 245 250 255
 Tyr Lys Asp Cys His Leu Ala Gln Val Pro Ser His Thr Val Val Ala

	260	265	270
	Arg Ser Met Gly Gly Lys Glu Asp Leu Ile Trp Glu Leu Leu Asn Gln		
	275	280	285
	Ala Gln Glu His Phe Gly Lys Asp Lys Ser Lys Glu Phe Gln Leu Phe		
5	290	295	300
	Ser Ser Pro His Gly Lys Asp Leu Leu Phe Lys Asp Ser Ala His Gly		
	305	310	315 320
	Phe Leu Lys Val Pro Pro Arg Met Asp Ala Lys Met Tyr Leu Gly Tyr		
	325	330	335
10	Glu Tyr Val Thr Ala Ile Arg Asn Leu Arg Glu Gly Thr Cys Pro Glu		
	340	345	350
	Ala Pro Thr Asp Glu Cys Lys Pro Val Lys Trp Cys Ala Leu Ser His		
	355	360	365
	His Glu Arg Leu Lys Cys Asp Glu Trp Ser Val Asn Ser Val Gly Lys		
15	370	375	380
	Ile Glu Cys Val Ser Ala Glu Thr Thr Glu Asp Cys Ile Ala Lys Ile		
	385	390	395 400
	Met Asn Gly Glu Ala Asp Ala Met Ser Leu Asp Gly Gly Phe Val Tyr		
	405	410	415
20	Ile Ala Gly Lys Cys Gly Leu Val Pro Val Leu Ala Glu Asn Tyr Asn		
	420	425	430
	Lys Ser Asp Asn Cys Glu Asp Thr Pro Glu Ala Gly Tyr Phe Ala Val		
	435	440	445
	Ala Val Val Lys Lys Ser Ala Ser Asp Leu Thr Trp Asp Asn Leu Lys		
25	450	455	460
	Gly Lys Lys Ser Cys His Thr Ala Val Gly Arg Thr Ala Gly Trp Asn		
	465	470	475 480
	Ile Pro Met Gly Leu Leu Tyr Asn Lys Ile Asn His Cys Arg Phe Asp		
	485	490	495
30	Glu Phe Phe Ser Glu Gly Cys Ala Pro Gly Ser Lys Lys Asp Ser Ser		
	500	505	510
	Leu Cys Lys Leu Cys Met Gly Ser Gly Leu Asn Leu Cys Glu Pro Asn		

	515	520	525
	Asn Lys Glu Gly Tyr Tyr Gly Tyr Thr Gly Ala Phe Arg Cys Leu Val		
	530	535	540
	Glu Lys Gly Asp Val Ala Phe Val Lys His Gln Thr Val Pro Gln Asn		
5	545	550	555 560
	Thr Gly Gly Lys Asn Pro Asp Pro Trp Ala Lys Asn Leu Asn Glu Lys		
	565	570	575
	Asp Tyr Glu Leu Leu Cys Leu Asp Gly Thr Arg Lys Pro Val Glu Glu		
	580	585	590
10	Tyr Ala Asn Cys His Leu Ala Arg Ala Pro Asn His Ala Val Val Thr		
	595	600	605
	Arg Lys Asp Lys Glu Ala Cys Val His Lys Ile Leu Arg Gln Gln Gln		
	610	615	620
	His Leu Phe Gly Ser Asn Val Thr Asp Cys Ser Gly Asn Phe Cys Leu		
15	625	630	635 640
	Phe Arg Ser Glu Thr Lys Asp Leu Leu Phe Arg Asp Asp Thr Val Cys		
	645	650	655
	Leu Ala Lys Leu His Asp Arg Asn Thr Tyr Glu Lys Tyr Leu Gly Glu		
	660	665	670
20	Glu Tyr Val Lys Ala Val Gly Asn Leu Arg Lys Cys Ser Thr Ser Ser		
	675	680	685
	Leu Leu Glu Ala Cys Thr Phe Arg Arg Pro Gly Ser Gly Ser Gly Ser		
	690	695	700
	Gly Ser Gly Ser Gly Ser Gly Ser Gly Ser Gly Ser Gly Ser Gly Val		
25	705	710	715 720
	Ser Asp Val Pro Arg Asp Leu Glu Val Val Ala Ala Thr Pro Thr Ser		
	725	730	735
	Leu Leu Ile Ser Trp Ser Ala Arg Leu Lys Val Ala Arg Tyr Tyr Arg		
	740	745	750
30	Ile Thr Tyr Gly Glu Thr Gly Gly Asn Ser Pro Val Gln Glu Phe Thr		
	755	760	765
	Val Pro Lys Asn Val Tyr Thr Ala Thr Ile Ser Gly Leu Lys Pro Gly		

770 775 780
 Val Asp Tyr Thr Ile Thr Val Tyr Ala Val Thr Arg Phe Arg Asp Tyr
 785 790 795 800
 Gln Pro Ile Ser Ile Asn Tyr Arg Thr
 5 805
 <210> 241
 <211> 778
 <212> PRT
 <213> Sequência artificial
 10 <220>
 <223> Descrição de Sequência artificial: construto sintético
 <400> 241
 Met Gly Val Ser Asp Val Pro Arg Asp Leu Glu Val Val Ala Ala Thr
 1 5 10 15
 15 Pro Thr Ser Leu Leu Ile Ser Trp Ser Ala Arg Leu Lys Val Ala Arg
 20 25 30
 Tyr Tyr Arg Ile Thr Tyr Gly Glu Thr Gly Gly Asn Ser Pro Val Gln
 35 40 45
 Glu Phe Thr Val Pro Lys Asn Val Tyr Thr Ala Thr Ile Ser Gly Leu
 20 50 55 60
 Lys Pro Gly Val Asp Tyr Thr Ile Thr Val Tyr Ala Val Thr Arg Phe
 65 70 75 80
 Arg Asp Tyr Gln Pro Ile Ser Ile Asn Tyr Arg Thr Glu Ile Asp Lys
 85 90 95
 25 Pro Ser Gln Val Pro Asp Lys Thr Val Arg Trp Cys Ala Val Ser Glu
 100 105 110
 His Glu Ala Thr Lys Cys Gln Ser Phe Arg Asp His Met Lys Ser Val
 115 120 125
 Ile Pro Ser Asp Gly Pro Ser Val Ala Cys Val Lys Lys Ala Ser Tyr
 30 130 135 140
 Leu Asp Cys Ile Arg Ala Ile Ala Ala Asn Glu Ala Asp Ala Val Thr
 145 150 155 160

Leu Asp Ala Gly Leu Val Tyr Asp Ala Tyr Leu Ala Pro Asn Asn Leu
 165 170 175
 Lys Pro Val Val Ala Glu Phe Tyr Gly Ser Lys Glu Asp Pro Gln Thr
 180 185 190
 5 Phe Tyr Tyr Ala Val Ala Val Val Lys Lys Asp Ser Gly Phe Gln Met
 195 200 205
 Asn Gln Leu Arg Gly Lys Lys Ser Cys His Thr Gly Leu Gly Arg Ser
 210 215 220
 Ala Gly Trp Asn Ile Pro Ile Gly Leu Leu Tyr Cys Asp Leu Pro Glu
 10 225 230 235 240
 Pro Arg Lys Pro Leu Glu Lys Ala Val Ala Asn Phe Phe Ser Gly Ser
 245 250 255
 Cys Ala Pro Cys Ala Asp Gly Thr Asp Phe Pro Gln Leu Cys Gln Leu
 260 265 270
 15 Cys Pro Gly Cys Gly Cys Ser Thr Leu Asn Gln Tyr Phe Gly Tyr Ser
 275 280 285
 Gly Ala Phe Lys Cys Leu Lys Asp Gly Ala Gly Asp Val Ala Phe Val
 290 295 300
 Lys His Ser Thr Ile Phe Glu Asn Leu Ala Asn Lys Ala Asp Arg Asp
 20 305 310 315 320
 Gln Tyr Glu Leu Leu Cys Leu Asp Asn Thr Arg Lys Pro Val Asp Glu
 325 330 335
 Tyr Lys Asp Cys His Leu Ala Gln Val Pro Ser His Thr Val Val Ala
 340 345 350
 25 Arg Ser Met Gly Gly Lys Glu Asp Leu Ile Trp Glu Leu Leu Asn Gln
 355 360 365
 Ala Gln Glu His Phe Gly Lys Asp Lys Ser Lys Glu Phe Gln Leu Phe
 370 375 380
 Ser Ser Pro His Gly Lys Asp Leu Leu Phe Lys Asp Ser Ala His Gly
 30 385 390 395 400
 Phe Leu Lys Val Pro Pro Arg Met Asp Ala Lys Met Tyr Leu Gly Tyr
 405 410 415

Glu Tyr Val Thr Ala Ile Arg Asn Leu Arg Glu Gly Thr Cys Pro Glu
 420 425 430
 Ala Pro Thr Asp Glu Cys Lys Pro Val Lys Trp Cys Ala Leu Ser His
 435 440 445
 5 His Glu Arg Leu Lys Cys Asp Glu Trp Ser Val Asn Ser Val Gly Lys
 450 455 460
 Ile Glu Cys Val Ser Ala Glu Thr Thr Glu Asp Cys Ile Ala Lys Ile
 465 470 475 480
 Met Asn Gly Glu Ala Asp Ala Met Ser Leu Asp Gly Gly Phe Val Tyr
 10 485 490 495
 Ile Ala Gly Lys Cys Gly Leu Val Pro Val Leu Ala Glu Asn Tyr Asn
 500 505 510
 Lys Ser Asp Asn Cys Glu Asp Thr Pro Glu Ala Gly Tyr Phe Ala Val
 515 520 525
 15 Ala Val Val Lys Lys Ser Ala Ser Asp Leu Thr Trp Asp Asn Leu Lys
 530 535 540
 Gly Lys Lys Ser Cys His Thr Ala Val Gly Arg Thr Ala Gly Trp Asn
 545 550 555 560
 Ile Pro Met Gly Leu Leu Tyr Asn Lys Ile Asn His Cys Arg Phe Asp
 20 565 570 575
 Glu Phe Phe Ser Glu Gly Cys Ala Pro Gly Ser Lys Lys Asp Ser Ser
 580 585 590
 Leu Cys Lys Leu Cys Met Gly Ser Gly Leu Asn Leu Cys Glu Pro Asn
 595 600 605
 25 Asn Lys Glu Gly Tyr Tyr Gly Tyr Thr Gly Ala Phe Arg Cys Leu Val
 610 615 620
 Glu Lys Gly Asp Val Ala Phe Val Lys His Gln Thr Val Pro Gln Asn
 625 630 635 640
 Thr Gly Gly Lys Asn Pro Asp Pro Trp Ala Lys Asn Leu Asn Glu Lys
 30 645 650 655
 Asp Tyr Glu Leu Leu Cys Leu Asp Gly Thr Arg Lys Pro Val Glu Glu
 660 665 670

Tyr Ala Asn Cys His Leu Ala Arg Ala Pro Asn His Ala Val Val Thr
 675 680 685
 Arg Lys Asp Lys Glu Ala Cys Val His Lys Ile Leu Arg Gln Gln Gln
 690 695 700
 5 His Leu Phe Gly Ser Asn Val Thr Asp Cys Ser Gly Asn Phe Cys Leu
 705 710 715 720
 Phe Arg Ser Glu Thr Lys Asp Leu Leu Phe Arg Asp Asp Thr Val Cys
 725 730 735
 Leu Ala Lys Leu His Asp Arg Asn Thr Tyr Glu Lys Tyr Leu Gly Glu
 10 740 745 750
 Glu Tyr Val Lys Ala Val Gly Asn Leu Arg Lys Cys Ser Thr Ser Ser
 755 760 765
 Leu Leu Glu Ala Cys Thr Phe Arg Arg Pro
 770 775
 15 <210> 242
 <211> 781
 <212> PRT
 <213> Sequência artificial
 <220>
 20 <223> Descrição de Sequência artificial: construto sintético
 <400> 242
 Met Gly Val Ser Asp Val Pro Arg Asp Leu Glu Val Val Ala Ala Thr
 1 5 10 15
 Pro Thr Ser Leu Leu Ile Ser Trp Ser Ala Arg Leu Lys Val Ala Arg
 25 20 25 30
 Tyr Tyr Arg Ile Thr Tyr Gly Glu Thr Gly Gly Asn Ser Pro Val Gln
 35 40 45
 Glu Phe Thr Val Pro Lys Asn Val Tyr Thr Ala Thr Ile Ser Gly Leu
 50 55 60
 30 Lys Pro Gly Val Asp Tyr Thr Ile Thr Val Tyr Ala Val Thr Arg Phe
 65 70 75 80
 Arg Asp Tyr Gln Pro Ile Ser Ile Asn Tyr Arg Thr Gly Ser Gly Ser

		85		90		95	
		Gly Ser Gly Ser Gly Ser Val Pro Asp Lys Thr Val Arg Trp Cys Ala					
		100		105		110	
		Val Ser Glu His Glu Ala Thr Lys Cys Gln Ser Phe Arg Asp His Met					
5		115		120		125	
		Lys Ser Val Ile Pro Ser Asp Gly Pro Ser Val Ala Cys Val Lys Lys					
		130		135		140	
		Ala Ser Tyr Leu Asp Cys Ile Arg Ala Ile Ala Ala Asn Glu Ala Asp					
		145		150		155	160
10		Ala Val Thr Leu Asp Ala Gly Leu Val Tyr Asp Ala Tyr Leu Ala Pro					
		165		170		175	
		Asn Asn Leu Lys Pro Val Val Ala Glu Phe Tyr Gly Ser Lys Glu Asp					
		180		185		190	
		Pro Gln Thr Phe Tyr Tyr Ala Val Ala Val Val Lys Lys Asp Ser Gly					
15		195		200		205	
		Phe Gln Met Asn Gln Leu Arg Gly Lys Lys Ser Cys His Thr Gly Leu					
		210		215		220	
		Gly Arg Ser Ala Gly Trp Asn Ile Pro Ile Gly Leu Leu Tyr Cys Asp					
		225		230		235	240
20		Leu Pro Glu Pro Arg Lys Pro Leu Glu Lys Ala Val Ala Asn Phe Phe					
		245		250		255	
		Ser Gly Ser Cys Ala Pro Cys Ala Asp Gly Thr Asp Phe Pro Gln Leu					
		260		265		270	
		Cys Gln Leu Cys Pro Gly Cys Gly Cys Ser Thr Leu Asn Gln Tyr Phe					
25		275		280		285	
		Gly Tyr Ser Gly Ala Phe Lys Cys Leu Lys Asp Gly Ala Gly Asp Val					
		290		295		300	
		Ala Phe Val Lys His Ser Thr Ile Phe Glu Asn Leu Ala Asn Lys Ala					
		305		310		315	320
30		Asp Arg Asp Gln Tyr Glu Leu Leu Cys Leu Asp Asn Thr Arg Lys Pro					
		325		330		335	
		Val Asp Glu Tyr Lys Asp Cys His Leu Ala Gln Val Pro Ser His Thr					

	340	345	350
	Val Val Ala Arg Ser Met Gly Gly Lys Glu Asp Leu Ile Trp Glu Leu		
	355	360	365
	Leu Asn Gln Ala Gln Glu His Phe Gly Lys Asp Lys Ser Lys Glu Phe		
5	370	375	380
	Gln Leu Phe Ser Ser Pro His Gly Lys Asp Leu Leu Phe Lys Asp Ser		
	385	390	395
	Ala His Gly Phe Leu Lys Val Pro Pro Arg Met Asp Ala Lys Met Tyr		400
	405	410	415
10	Leu Gly Tyr Glu Tyr Val Thr Ala Ile Arg Asn Leu Arg Glu Gly Thr		
	420	425	430
	Cys Pro Glu Ala Pro Thr Asp Glu Cys Lys Pro Val Lys Trp Cys Ala		
	435	440	445
	Leu Ser His His Glu Arg Leu Lys Cys Asp Glu Trp Ser Val Asn Ser		
15	450	455	460
	Val Gly Lys Ile Glu Cys Val Ser Ala Glu Thr Thr Glu Asp Cys Ile		
	465	470	475
	Ala Lys Ile Met Asn Gly Glu Ala Asp Ala Met Ser Leu Asp Gly Gly		480
	485	490	495
20	Phe Val Tyr Ile Ala Gly Lys Cys Gly Leu Val Pro Val Leu Ala Glu		
	500	505	510
	Asn Tyr Asn Lys Ser Asp Asn Cys Glu Asp Thr Pro Glu Ala Gly Tyr		
	515	520	525
	Phe Ala Val Ala Val Val Lys Lys Ser Ala Ser Asp Leu Thr Trp Asp		
25	530	535	540
	Asn Leu Lys Gly Lys Lys Ser Cys His Thr Ala Val Gly Arg Thr Ala		
	545	550	555
	Gly Trp Asn Ile Pro Met Gly Leu Leu Tyr Asn Lys Ile Asn His Cys		560
	565	570	575
30	Arg Phe Asp Glu Phe Phe Ser Glu Gly Cys Ala Pro Gly Ser Lys Lys		
	580	585	590
	Asp Ser Ser Leu Cys Lys Leu Cys Met Gly Ser Gly Leu Asn Leu Cys		

595 600 605
 Glu Pro Asn Asn Lys Glu Gly Tyr Tyr Gly Tyr Thr Gly Ala Phe Arg
 610 615 620
 Cys Leu Val Glu Lys Gly Asp Val Ala Phe Val Lys His Gln Thr Val
 5 625 630 635 640
 Pro Gln Asn Thr Gly Gly Lys Asn Pro Asp Pro Trp Ala Lys Asn Leu
 645 650 655
 Asn Glu Lys Asp Tyr Glu Leu Leu Cys Leu Asp Gly Thr Arg Lys Pro
 660 665 670
 10 Val Glu Glu Tyr Ala Asn Cys His Leu Ala Arg Ala Pro Asn His Ala
 675 680 685
 Val Val Thr Arg Lys Asp Lys Glu Ala Cys Val His Lys Ile Leu Arg
 690 695 700
 Gln Gln Gln His Leu Phe Gly Ser Asn Val Thr Asp Cys Ser Gly Asn
 15 705 710 715 720
 Phe Cys Leu Phe Arg Ser Glu Thr Lys Asp Leu Leu Phe Arg Asp Asp
 725 730 735
 Thr Val Cys Leu Ala Lys Leu His Asp Arg Asn Thr Tyr Glu Lys Tyr
 740 745 750
 20 Leu Gly Glu Glu Tyr Val Lys Ala Val Gly Asn Leu Arg Lys Cys Ser
 755 760 765
 Thr Ser Ser Leu Leu Glu Ala Cys Thr Phe Arg Arg Pro
 770 775 780
 <210> 243
 25 <211> 791
 <212> PRT
 <213> Sequência artificial
 <220>
 <223> Descrição de Sequência artificial: construto sintético
 30 <400> 243
 Met Gly Val Ser Asp Val Pro Arg Asp Leu Glu Val Val Ala Ala Thr
 1 5 10 15

Pro Thr Ser Leu Leu Ile Ser Trp Ser Ala Arg Leu Lys Val Ala Arg
 20 25 30
 Tyr Tyr Arg Ile Thr Tyr Gly Glu Thr Gly Gly Asn Ser Pro Val Gln
 35 40 45
 5 Glu Phe Thr Val Pro Lys Asn Val Tyr Thr Ala Thr Ile Ser Gly Leu
 50 55 60
 Lys Pro Gly Val Asp Tyr Thr Ile Thr Val Tyr Ala Val Thr Arg Phe
 65 70 75 80
 Arg Asp Tyr Gln Pro Ile Ser Ile Asn Tyr Arg Thr Gly Ser Gly Ser
 10 85 90 95
 Gly Ser Gly Ser Gly Ser Gly Ser Gly Ser Gly Ser Gly Ser Gly Ser
 100 105 110
 Val Pro Asp Lys Thr Val Arg Trp Cys Ala Val Ser Glu His Glu Ala
 115 120 125
 15 Thr Lys Cys Gln Ser Phe Arg Asp His Met Lys Ser Val Ile Pro Ser
 130 135 140
 Asp Gly Pro Ser Val Ala Cys Val Lys Lys Ala Ser Tyr Leu Asp Cys
 145 150 155 160
 Ile Arg Ala Ile Ala Ala Asn Glu Ala Asp Ala Val Thr Leu Asp Ala
 165 170 175
 20 Gly Leu Val Tyr Asp Ala Tyr Leu Ala Pro Asn Asn Leu Lys Pro Val
 180 185 190
 Val Ala Glu Phe Tyr Gly Ser Lys Glu Asp Pro Gln Thr Phe Tyr Tyr
 195 200 205
 25 Ala Val Ala Val Val Lys Lys Asp Ser Gly Phe Gln Met Asn Gln Leu
 210 215 220
 Arg Gly Lys Lys Ser Cys His Thr Gly Leu Gly Arg Ser Ala Gly Trp
 225 230 235 240
 Asn Ile Pro Ile Gly Leu Leu Tyr Cys Asp Leu Pro Glu Pro Arg Lys
 245 250 255
 30 Pro Leu Glu Lys Ala Val Ala Asn Phe Phe Ser Gly Ser Cys Ala Pro
 260 265 270

Cys Ala Asp Gly Thr Asp Phe Pro Gln Leu Cys Gln Leu Cys Pro Gly
 275 280 285
 Cys Gly Cys Ser Thr Leu Asn Gln Tyr Phe Gly Tyr Ser Gly Ala Phe
 290 295 300
 5 Lys Cys Leu Lys Asp Gly Ala Gly Asp Val Ala Phe Val Lys His Ser
 305 310 315 320
 Thr Ile Phe Glu Asn Leu Ala Asn Lys Ala Asp Arg Asp Gln Tyr Glu
 325 330 335
 Leu Leu Cys Leu Asp Asn Thr Arg Lys Pro Val Asp Glu Tyr Lys Asp
 10 340 345 350
 Cys His Leu Ala Gln Val Pro Ser His Thr Val Val Ala Arg Ser Met
 355 360 365
 Gly Gly Lys Glu Asp Leu Ile Trp Glu Leu Leu Asn Gln Ala Gln Glu
 370 375 380
 15 His Phe Gly Lys Asp Lys Ser Lys Glu Phe Gln Leu Phe Ser Ser Pro
 385 390 395 400
 His Gly Lys Asp Leu Leu Phe Lys Asp Ser Ala His Gly Phe Leu Lys
 405 410 415
 Val Pro Pro Arg Met Asp Ala Lys Met Tyr Leu Gly Tyr Glu Tyr Val
 20 420 425 430
 Thr Ala Ile Arg Asn Leu Arg Glu Gly Thr Cys Pro Glu Ala Pro Thr
 435 440 445
 Asp Glu Cys Lys Pro Val Lys Trp Cys Ala Leu Ser His His Glu Arg
 450 455 460
 25 Leu Lys Cys Asp Glu Trp Ser Val Asn Ser Val Gly Lys Ile Glu Cys
 465 470 475 480
 Val Ser Ala Glu Thr Thr Glu Asp Cys Ile Ala Lys Ile Met Asn Gly
 485 490 495
 Glu Ala Asp Ala Met Ser Leu Asp Gly Gly Phe Val Tyr Ile Ala Gly
 30 500 505 510
 Lys Cys Gly Leu Val Pro Val Leu Ala Glu Asn Tyr Asn Lys Ser Asp
 515 520 525

Asn Cys Glu Asp Thr Pro Glu Ala Gly Tyr Phe Ala Val Ala Val Val
 530 535 540
 Lys Lys Ser Ala Ser Asp Leu Thr Trp Asp Asn Leu Lys Gly Lys Lys
 545 550 555 560
 5 Ser Cys His Thr Ala Val Gly Arg Thr Ala Gly Trp Asn Ile Pro Met
 565 570 575
 Gly Leu Leu Tyr Asn Lys Ile Asn His Cys Arg Phe Asp Glu Phe Phe
 580 585 590
 Ser Glu Gly Cys Ala Pro Gly Ser Lys Lys Asp Ser Ser Leu Cys Lys
 10 595 600 605
 Leu Cys Met Gly Ser Gly Leu Asn Leu Cys Glu Pro Asn Asn Lys Glu
 610 615 620
 Gly Tyr Tyr Gly Tyr Thr Gly Ala Phe Arg Cys Leu Val Glu Lys Gly
 625 630 635 640
 15 Asp Val Ala Phe Val Lys His Gln Thr Val Pro Gln Asn Thr Gly Gly
 645 650 655
 Lys Asn Pro Asp Pro Trp Ala Lys Asn Leu Asn Glu Lys Asp Tyr Glu
 660 665 670
 Leu Leu Cys Leu Asp Gly Thr Arg Lys Pro Val Glu Glu Tyr Ala Asn
 20 675 680 685
 Cys His Leu Ala Arg Ala Pro Asn His Ala Val Val Thr Arg Lys Asp
 690 695 700
 Lys Glu Ala Cys Val His Lys Ile Leu Arg Gln Gln Gln His Leu Phe
 705 710 715 720
 25 Gly Ser Asn Val Thr Asp Cys Ser Gly Asn Phe Cys Leu Phe Arg Ser
 725 730 735
 Glu Thr Lys Asp Leu Leu Phe Arg Asp Asp Thr Val Cys Leu Ala Lys
 740 745 750
 Leu His Asp Arg Asn Thr Tyr Glu Lys Tyr Leu Gly Glu Glu Tyr Val
 30 755 760 765
 Lys Ala Val Gly Asn Leu Arg Lys Cys Ser Thr Ser Ser Leu Leu Glu
 770 775 780

Ala Cys Thr Phe Arg Arg Pro

785

790

<210> 244

<211> 7

5 <212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Descrição de Sequência artificial: peptídeo sintético

<400> 244

10 Pro Ser Thr Ser Thr Ser Thr

1

5

<210> 245

<211> 7

<212> PRT

15 <213> Sequência artificial

<220>

<223> Descrição de Sequência artificial: peptídeo sintético

<400> 245

Glu Ile Asp Lys Pro Ser Gln

20

1

5

<210> 246

<211> 10

<212> PRT

<213> Sequência artificial

25

<220>

<223> Descrição de Sequência artificial: peptídeo sintético

<400> 246

Gly Ser Gly Ser Gly Ser Gly Ser Gly Ser

1

5

10

30 <210> 247

<211> 423

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Descrição de Sequência artificial: construto sintético

<400> 247

5 Met Arg Phe Pro Ser Ile Phe Thr Ala Val Leu Phe Ala Ala Ser Ser
1 5 10 15
Ala Leu Ala Ala Pro Val Asn Thr Thr Thr Glu Asp Glu Thr Ala Gln
20 25 30
Ile Pro Ala Glu Ala Val Ile Gly Tyr Ser Asp Leu Glu Gly Asp Phe
10 35 40 45
Asp Val Ala Val Leu Pro Phe Ser Asn Ser Thr Asn Asn Gly Leu Leu
50 55 60
Phe Ile Asn Thr Thr Ile Ala Ser Ile Ala Ala Lys Glu Glu Gly Val
65 70 75 80
15 Ser Leu Glu Lys Arg Glu Ala Glu Ala Gly Val Ser Asp Val Pro Arg
85 90 95
Asp Leu Glu Val Val Ala Ala Thr Pro Thr Ser Leu Leu Ile Ser Trp
100 105 110
Ser Ala Arg Leu Lys Val Ala Arg Tyr Tyr Arg Ile Thr Tyr Gly Glu
20 115 120 125
Thr Gly Gly Asn Ser Pro Val Gln Glu Phe Thr Val Pro Lys Asn Val
130 135 140
Tyr Thr Ala Thr Ile Ser Gly Leu Lys Pro Gly Val Asp Tyr Thr Ile
145 150 155 160
25 Thr Val Tyr Ala Val Thr Arg Phe Arg Asp Tyr Gln Pro Ile Ser Ile
165 170 175
Asn Tyr Arg Thr Glu Ile Asp Lys Pro Ser Gln Asp Pro Gly Ser Glu
180 185 190
Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro
30 195 200 205
Glu Leu Leu Gly Gly Ser Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys
210 215 220

Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val
 225 230 235 240
 Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp
 245 250 255
 5 Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr
 260 265 270
 Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp
 275 280 285
 Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu
 10 290 295 300
 Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg
 305 310 315 320
 Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys
 325 330 335
 15 Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp
 340 345 350
 Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys
 355 360 365
 Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser
 20 370 375 380
 Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser
 385 390 395 400
 Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser
 405 410 415
 25 Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 420
 <210> 248
 <211> 10
 <212> RNA
 30 <213> Sequência artificial
 <220>
 <223> Descrição de Sequência artificial: oligonucleotídeo sintético

<400> 248

uagcggaugc

10

REIVINDICAÇÕES

1. Polipeptídeo compreendendo um décimo domínio de fibronectina do tipo III ($^{10}\text{Fn3}$) em que o domínio $^{10}\text{Fn3}$ (i) compreende uma alça, AB; uma alça, BC; uma alça, CD; uma alça, DE; uma alça EF; e uma alça FG; (ii) tem pelo menos uma alça selecionada da alça BC, DE e FG com uma sequência de aminoácido alterada com relação à sequência da alça correspondente do domínio $^{10}\text{Fn3}$ humano e (iii) se liga ao IGF-IR humano com uma constante de dissociação de cerca de 1 μM ou menos.
2. Polipeptídeo de acordo com a reivindicação 1, em que o domínio $^{10}\text{Fn3}$ se liga ao IGF-IR humano com uma constante de dissociação de cerca de 10 nM ou menos.
3. Polipeptídeo de acordo com a reivindicação 1, em que a alça BC e a alça FG têm uma sequência de aminoácido alterada com relação à sequência da alça correspondente do domínio $^{10}\text{Fn3}$ humano.
4. Polipeptídeo de acordo com a reivindicação 1, em que o domínio $^{10}\text{Fn3}$ compreende a sequência de aminoácido de qualquer uma de SEQ ID NOS: 2-125, 184-203 ou 226.
5. Polipeptídeo de acordo com a reivindicação 1, ainda compreendendo uma ou mais porções farmacocinéticas (PK) selecionadas de: uma porção polioxialquileno, uma proteína de ligação à albumina de soro humano, ácido siálico, albumina de soro humano, transferrina e um fragmento Fc.
6. Polipeptídeo de acordo com a reivindicação 5, em que a porção PK é uma porção de polioxialquileno e a referida porção de polioxialquileno é polietileno glicol.
7. Polipeptídeo de acordo com a reivindicação 1, ainda compreendendo um segundo domínio selecionado de: uma porção de anticorpo de menos de cerca de 50 kD; um derivado de lipocalina; um derivado de tetranelectina; um avímero; um derivado de anquirina e um segundo décimo domínio de fibronectina do tipo III ($^{10}\text{Fn3}$), em que o segundo domínio se liga a uma proteína humana e em que o segundo domínio $^{10}\text{Fn3}$ (i) compreende uma alça, AB; uma alça, BC; uma alça, CD; uma alça, DE; e uma alça FG; (ii) tem pelo menos uma alça selecionada da alça BC, DE e FG com uma

sequência de aminoácido aleatória com relação à sequência da alça correspondente do domínio $^{10}\text{Fn3}$ humano e (iii) se liga a uma proteína humana, a qual não é ligada pelo domínio $^{10}\text{Fn3}$ humano, com uma constante de dissociação de cerca de 10 nM ou menos.

5 8. Polipeptídeo de acordo com a reivindicação 7, em que o segundo domínio é o segundo domínio $^{10}\text{Fn3}$ e compreende a sequência de aminoácido de qualquer uma de SEQ ID NOS: 2-125, 184-203 ou 226.

9. Polipeptídeo de acordo com a reivindicação 7, em que o segundo domínio se liga ao IGF-IR humano.

10 10. Polipeptídeo de acordo com a reivindicação 7, em que o segundo domínio se liga ao VEGFR2 humano.

11. Polipeptídeo de acordo com a reivindicação 7, em que o segundo domínio é o segundo domínio $^{10}\text{Fn3}$ e compreende a sequência de aminoácido de qualquer uma de SEQ ID NOS: 126-183.

15 12. Polipeptídeo de acordo com a reivindicação 7, em que o domínio $^{10}\text{Fn3}$ e o segundo domínio são operavelmente ligados via pelo menos uma ligação de dissulfeto, uma ligação peptídica, um polipeptídeo, um açúcar polimérico ou uma porção polietileno glicol.

13. Polipeptídeo de acordo com qualquer uma das reivindicações precedentes em que o referido polipeptídeo inibe a ligação de IGF-I ou IGF-II ao IGF-IR e não ativa o IGF-IR humano em sub concentrações de IC50 em um ensaio baseado em célula.

14. Polipeptídeo de acordo com a reivindicação 1, em que o referido domínio $^{10}\text{Fn3}$ é selecionado através do método compreendendo as etapas de: a) produção de uma população de moléculas de RNA candidatas, cada uma compreendendo uma sequência do décimo domínio de fibronectina do tipo III ($^{10}\text{Fn3}$) candidata, sequência de domínio a qual difere da sequência de codificação do domínio $^{10}\text{Fn3}$ humano, as referidas moléculas de RNA compreendendo, cada uma, uma sequência de início de tradução e um códon inicial operavelmente ligado à referida sequência de codificação de domínio $^{10}\text{Fn3}$ candidata e cada uma sendo operavelmente ligada a um ligante de puromicina-ácido nucleico na extremidade 3'; b) tradução *in vitro*

das referidas sequências de codificação de domínio $^{10}\text{Fn3}$ candidatas para produzir uma população de fusões de RNA- $^{10}\text{Fn3}$ candidatas; c) contato da referida população de fusões de RNA- $^{10}\text{Fn3}$ candidatas com IGF-IR; e d) seleção de uma fusão de RNA- $^{10}\text{Fn3}$ candidata, a porção de proteína da qual tem uma afinidade ou especificidade de ligação pelo IGF-IR que é alterada com relação à afinidade ou especificidade de ligação do referido $^{10}\text{Fn3}$ humano pelo IGF-IR.

15. Composição farmacêuticamente aceitável compreendendo o polipeptídeo de acordo com qualquer uma das reivindicações precedentes, em que a composição é essencialmente isenta de endotoxina.

FIG. 1

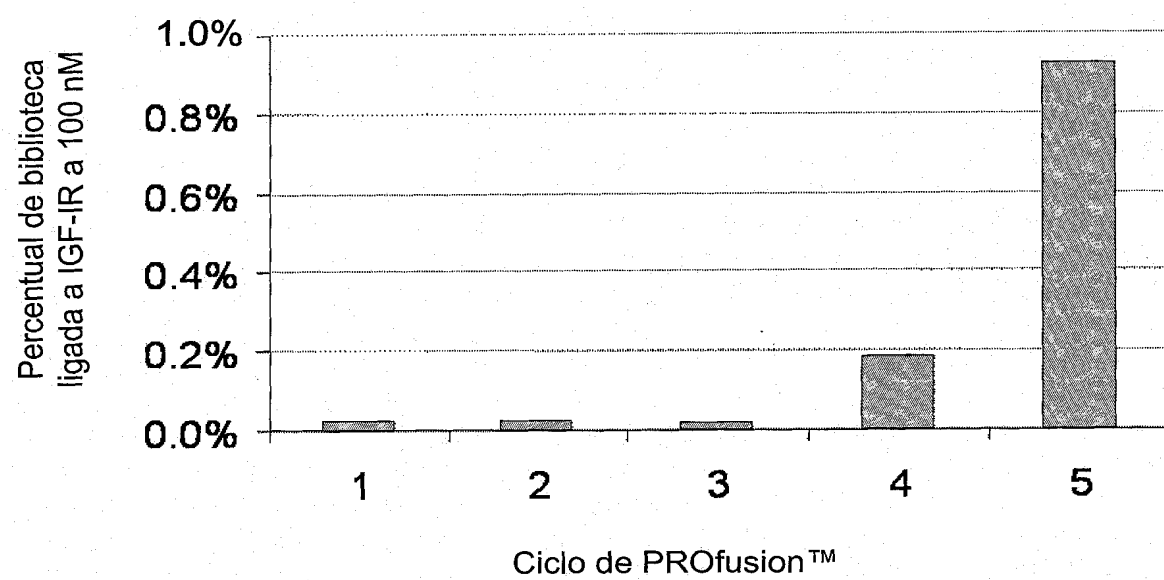


FIG. 2

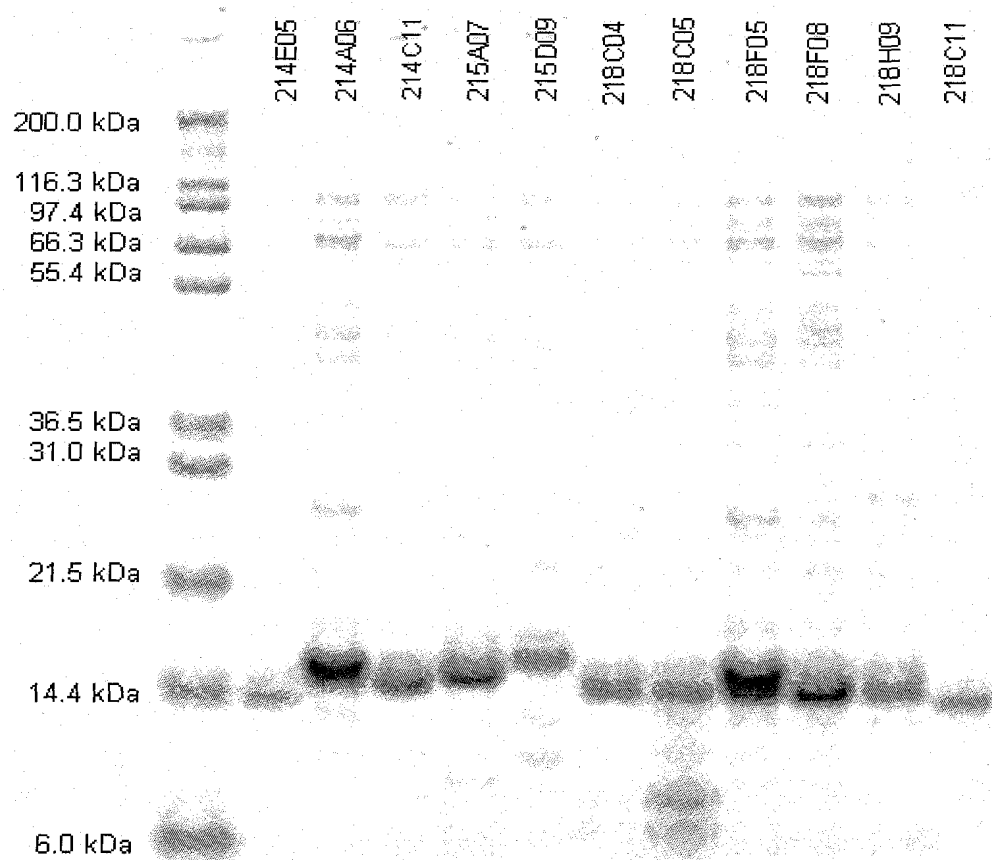
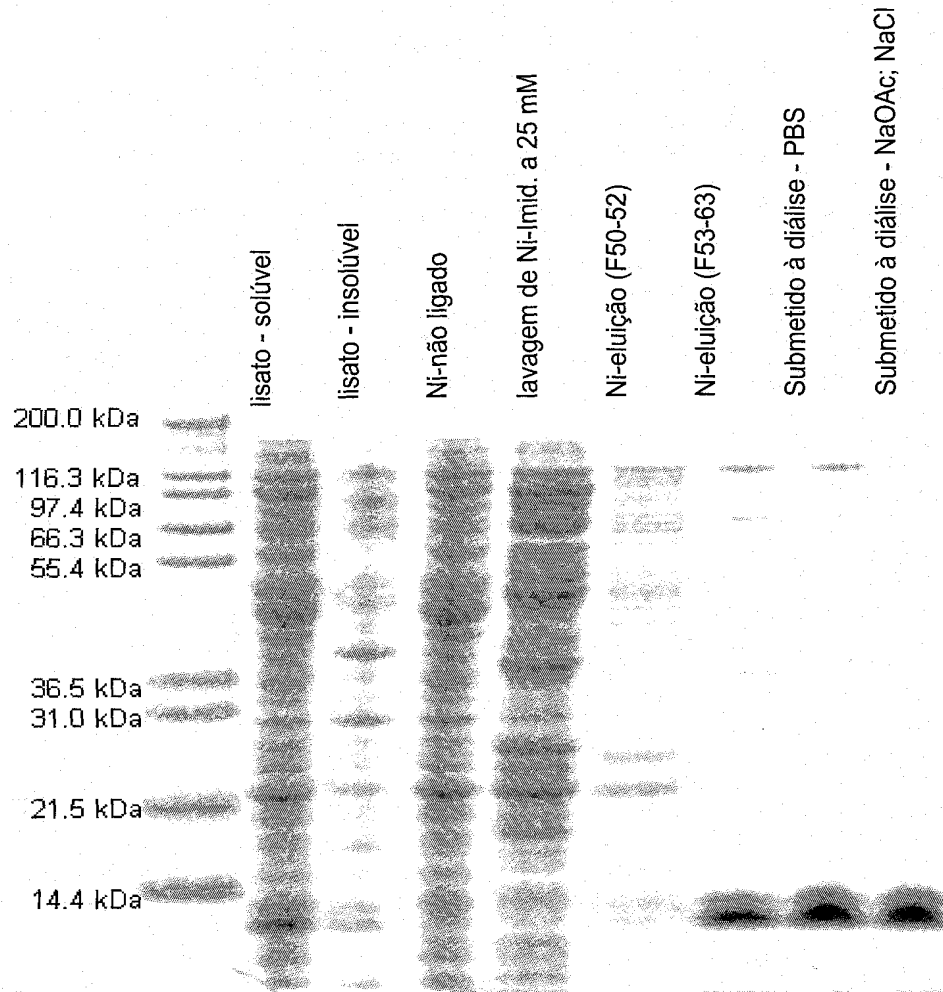


FIG. 3



4/36

FIG. 4

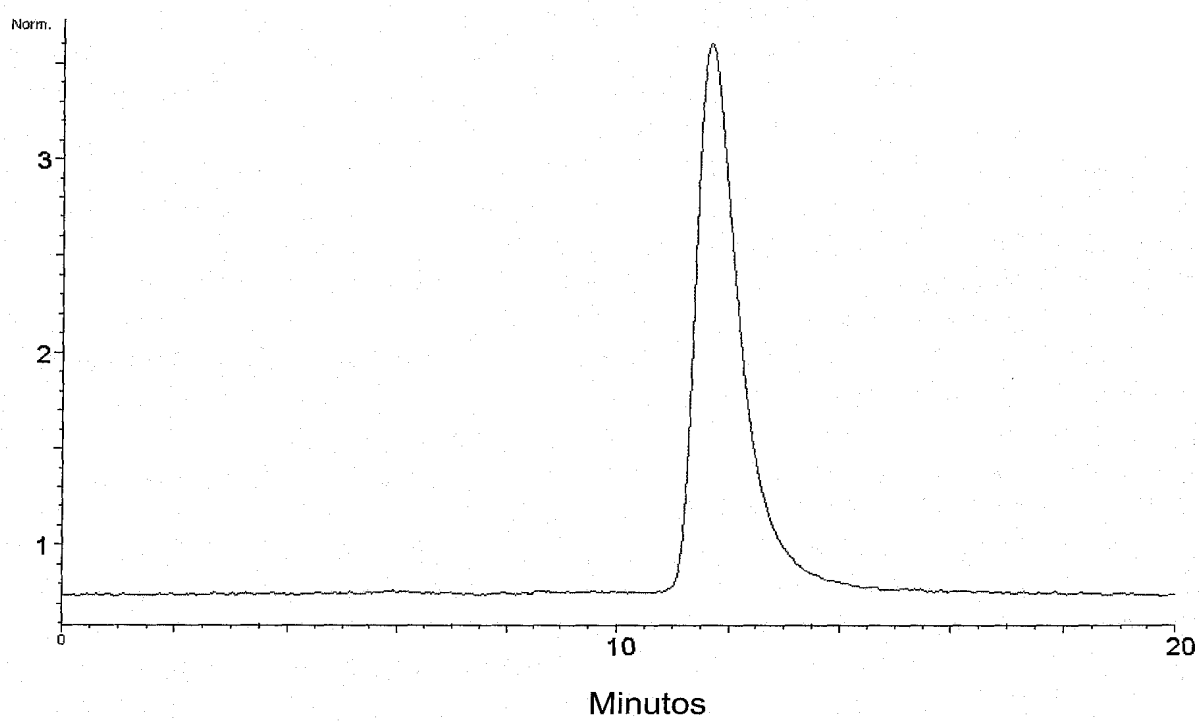
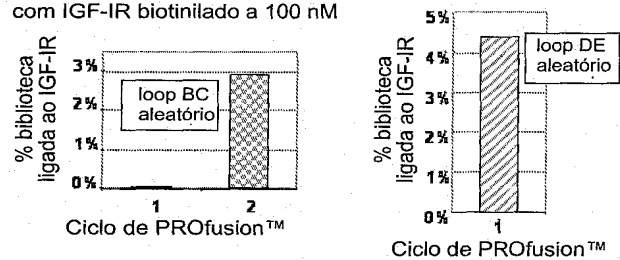
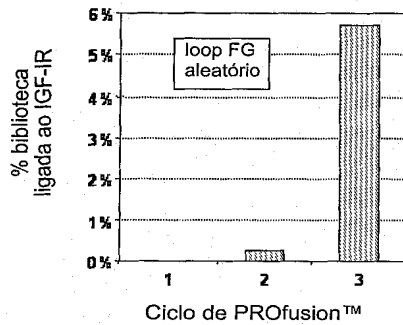


FIG. 5

(a) bibliotecas com um loop aleatório foram otimizadas usando PROFusion™ com IGF-IR biotilado a 100 nM



(b) loops individuais são amplificados e recombinaados em uma biblioteca mestre



(c) biblioteca recombinada é otimizada
ciclo 1: IGF-IR revestido sobre glóbulos magnéticos
ciclos 2-4: IGF-IR biotilado a 1 nM

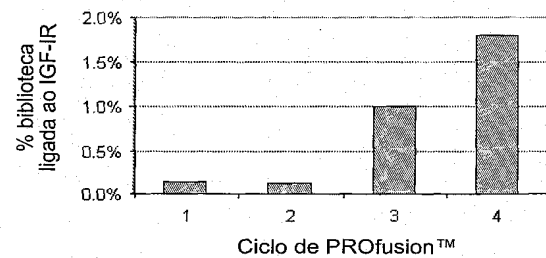


FIG. 6

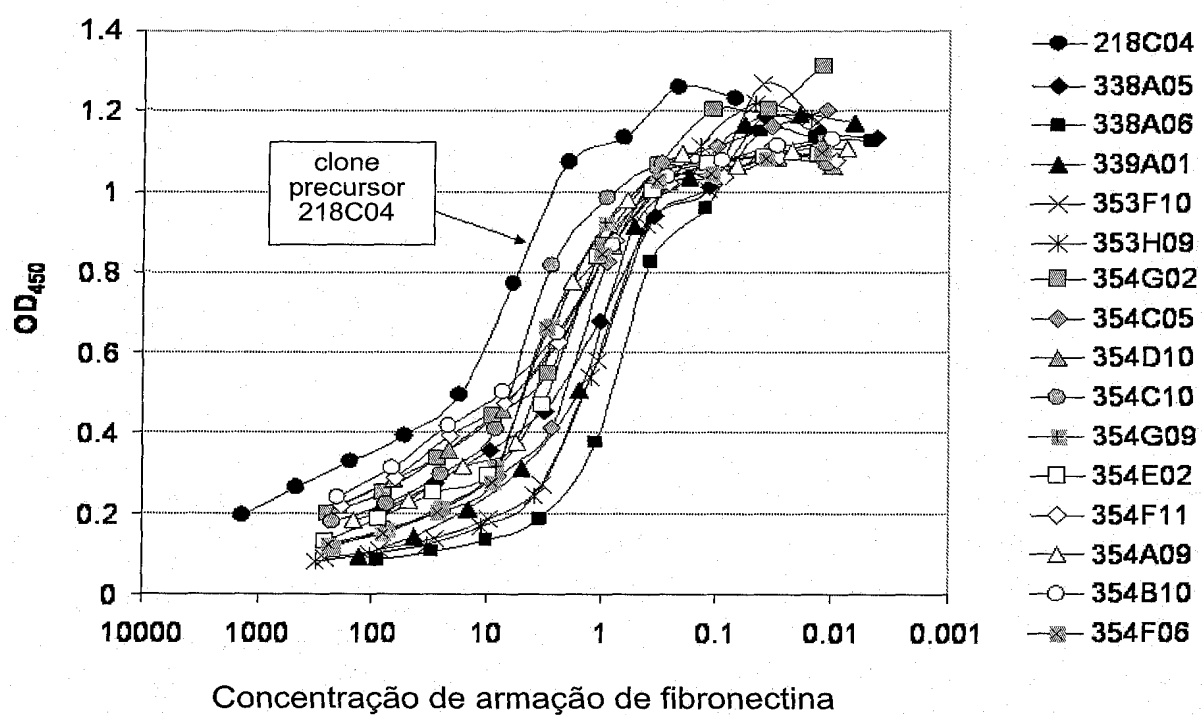


FIG. 7

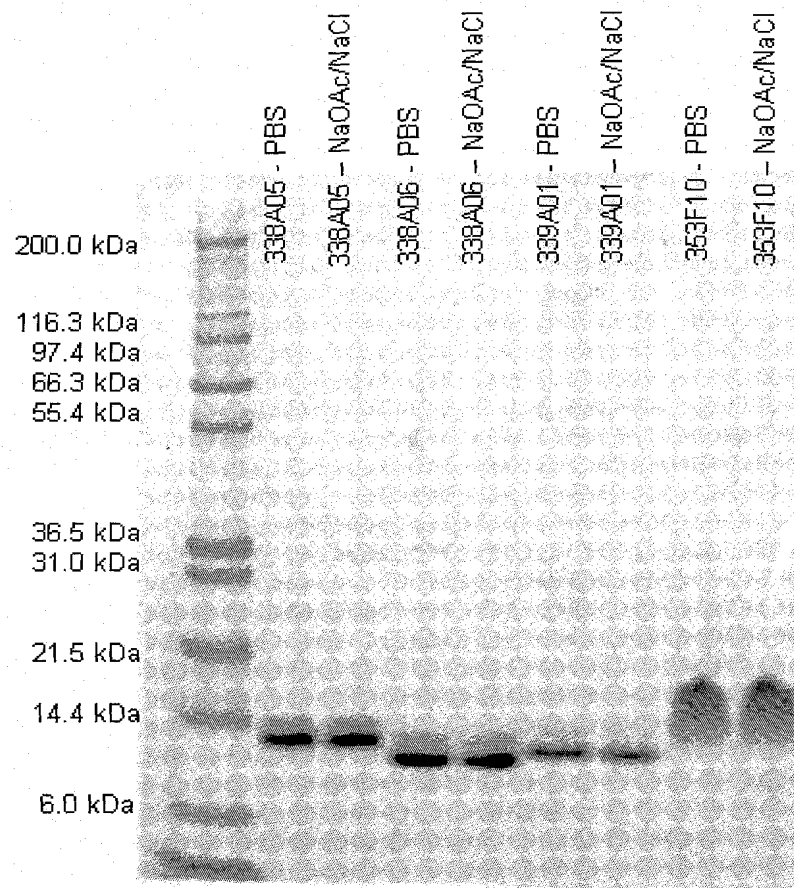


FIG. 8

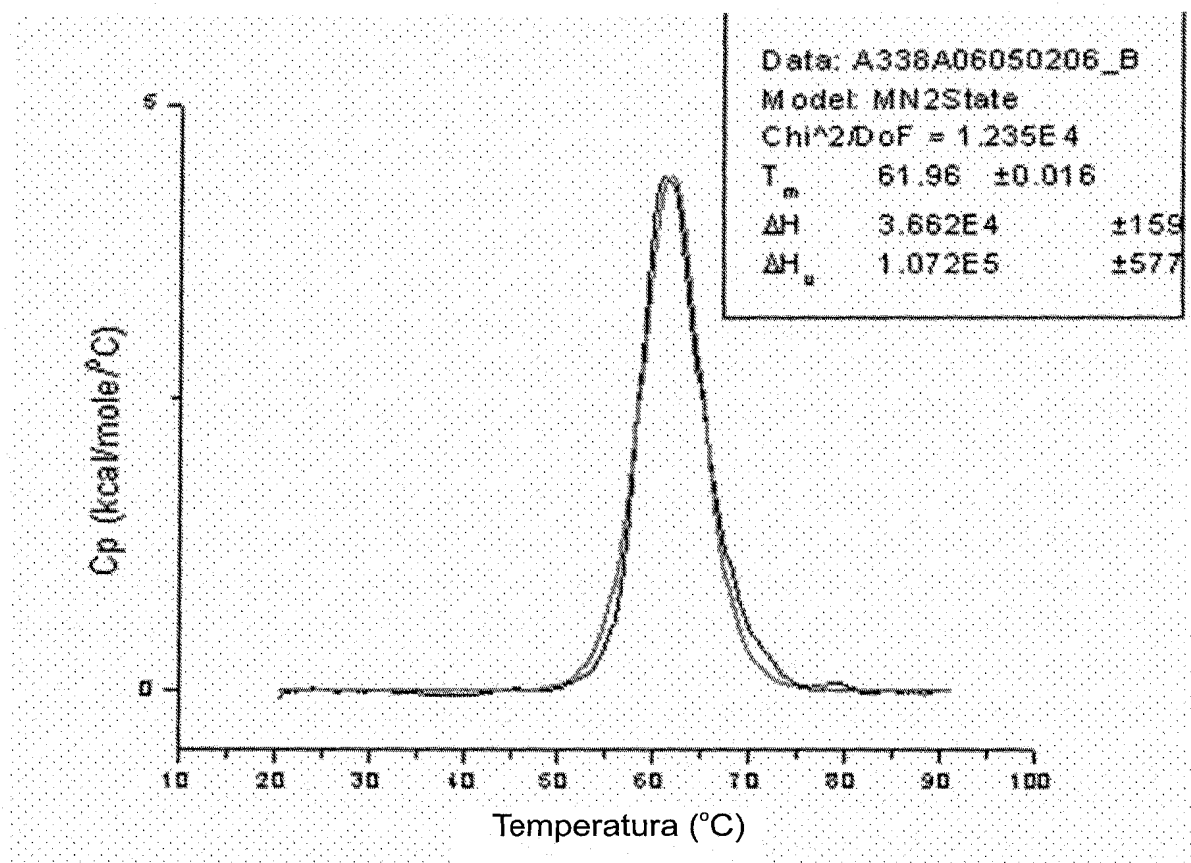


FIG. 9

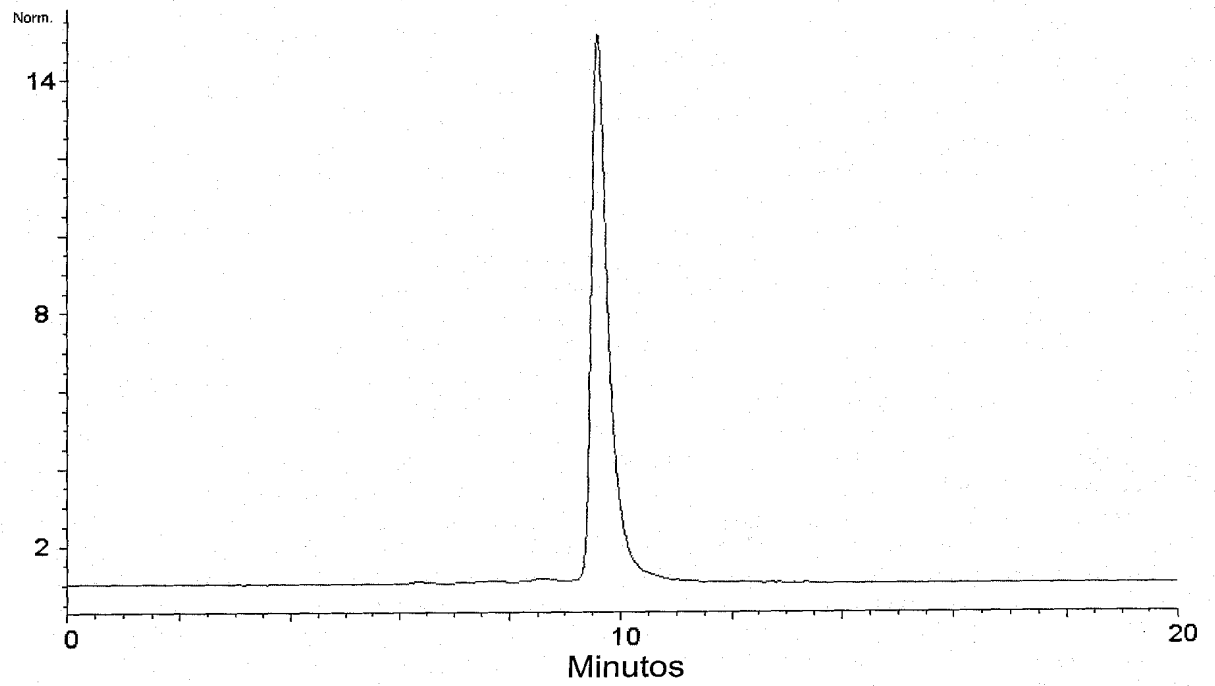
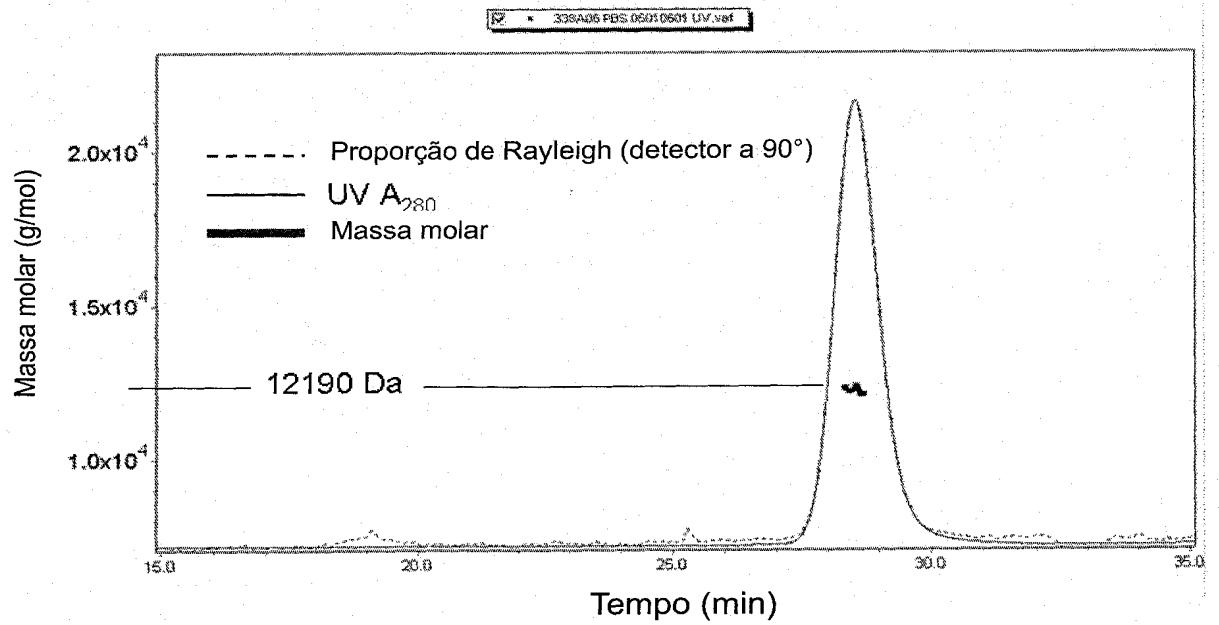


FIG. 10

Massa molar vs. tempo



10/36

FIG. 11

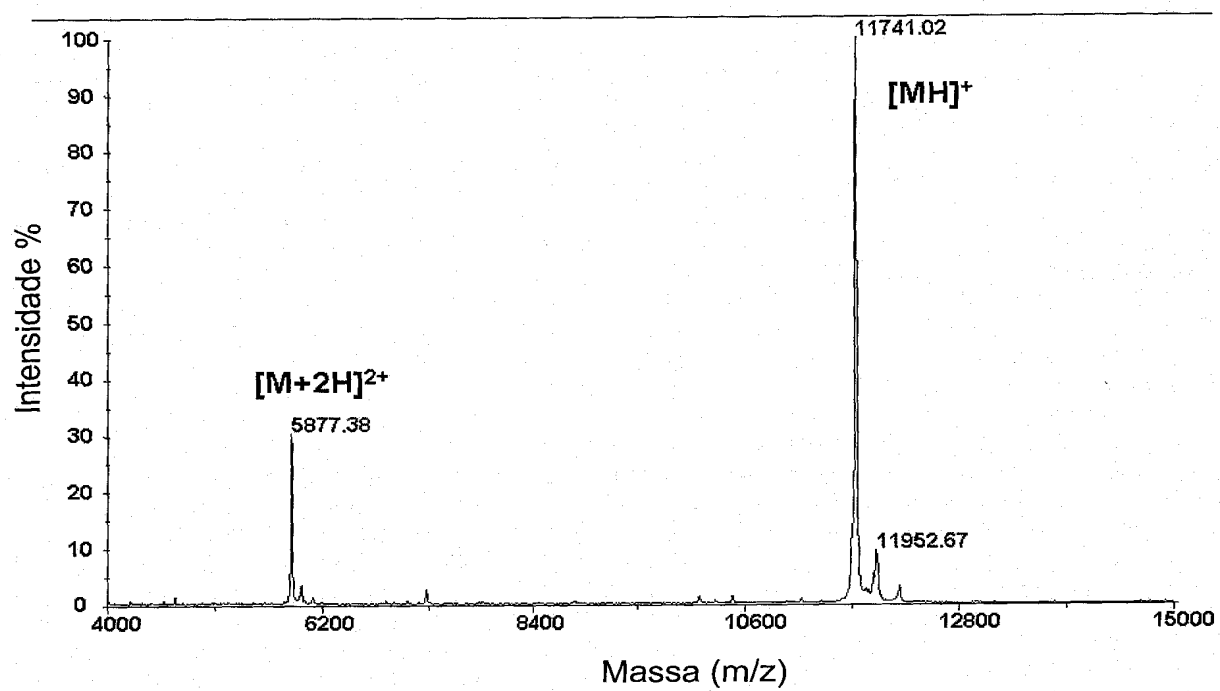


FIG. 12

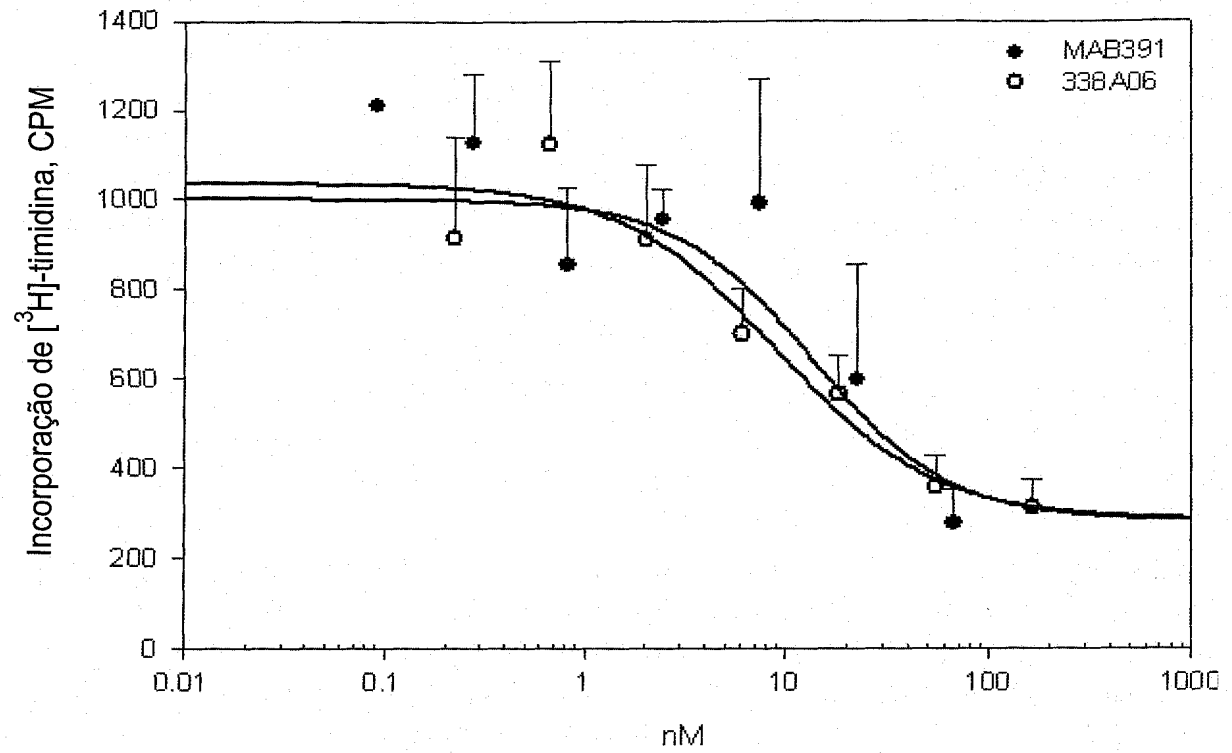


FIG. 13

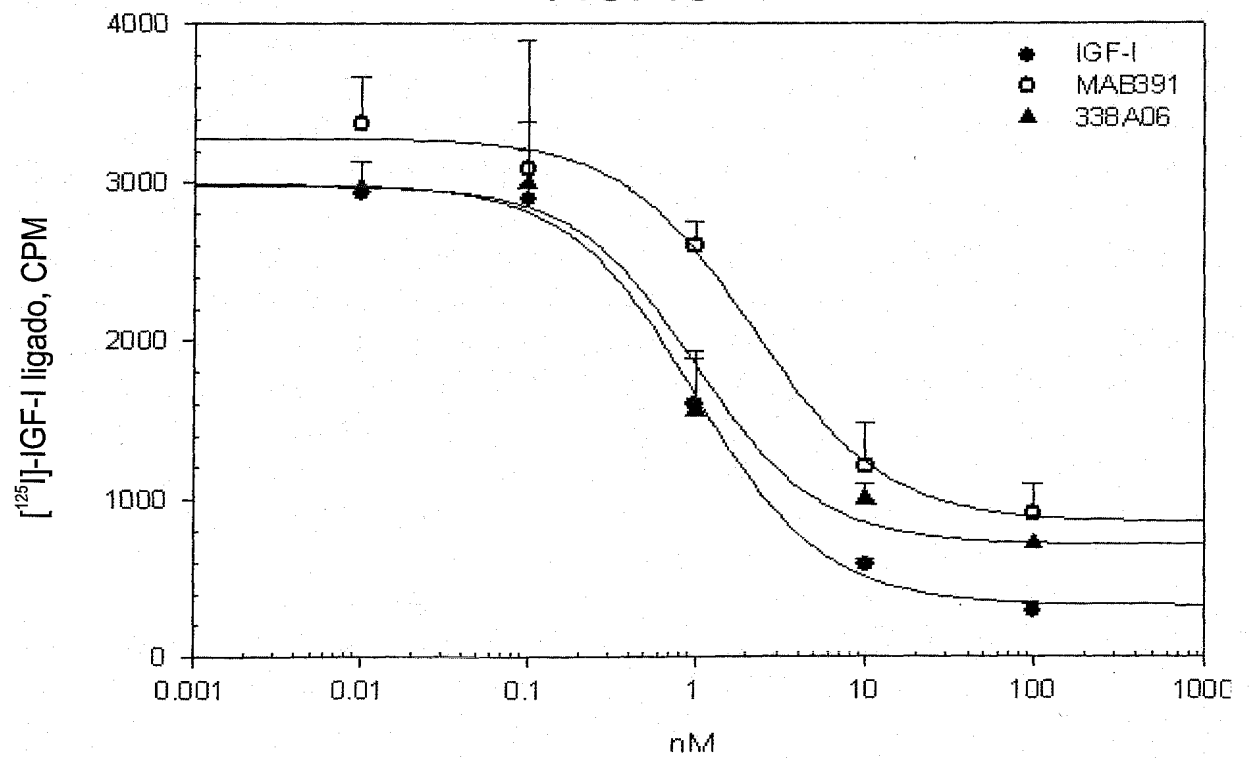


FIG. 14

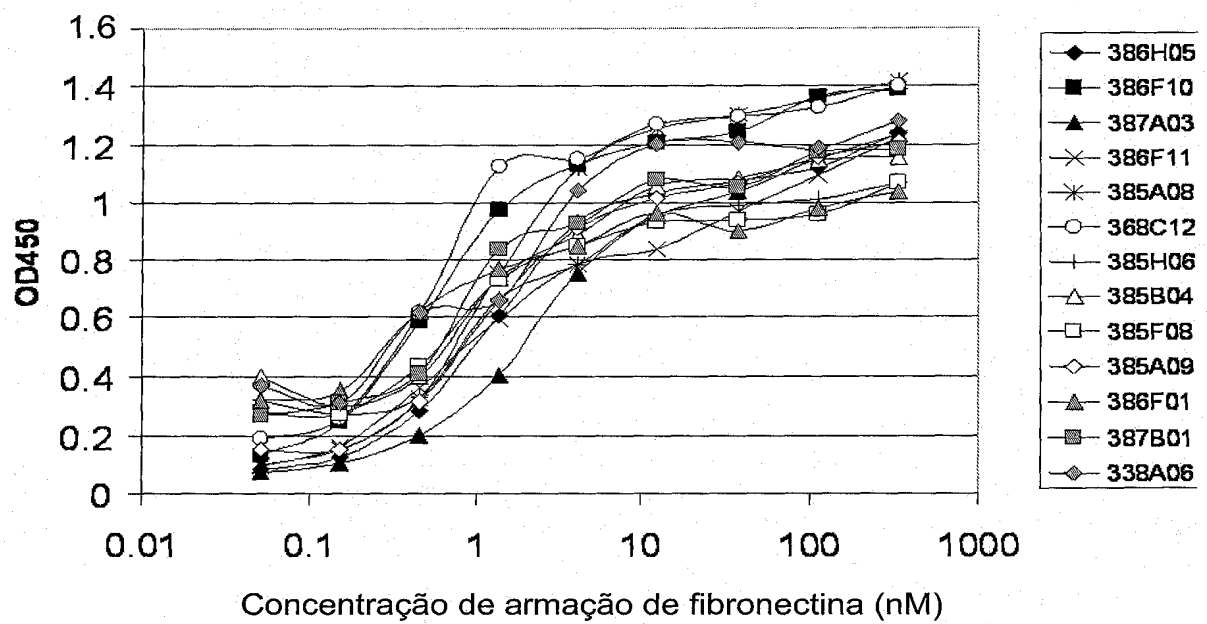


FIG. 15

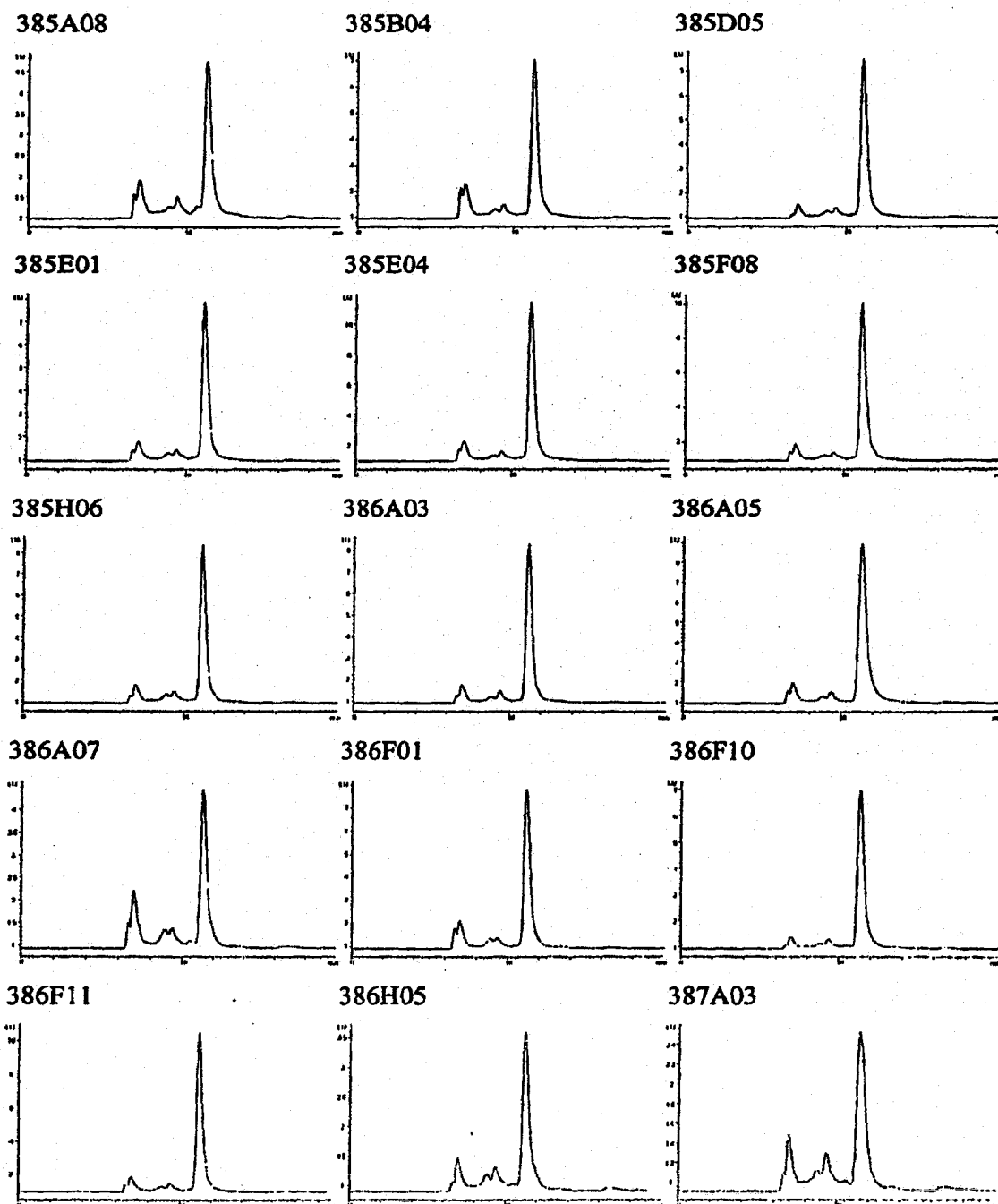
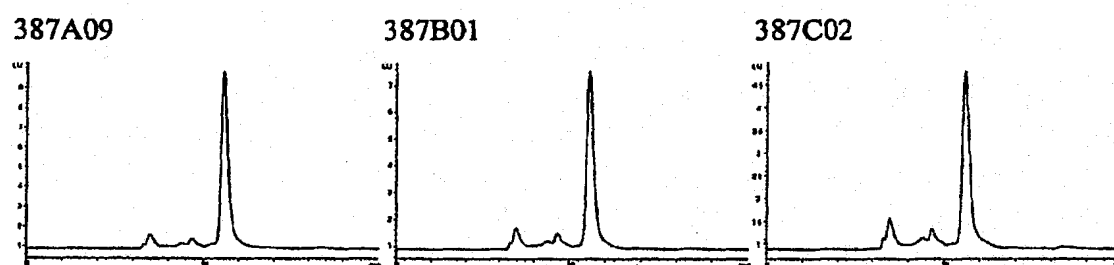


FIG. 15 (CONT.)



15/36

FIG. 16

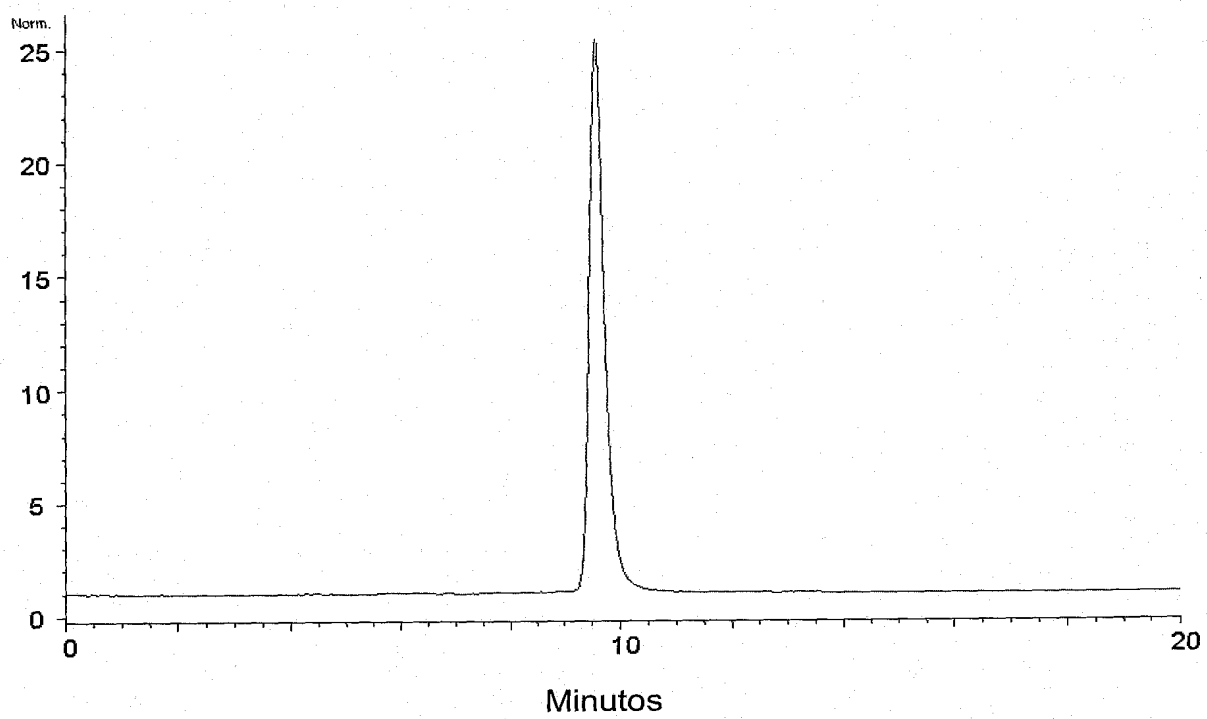


FIG. 17

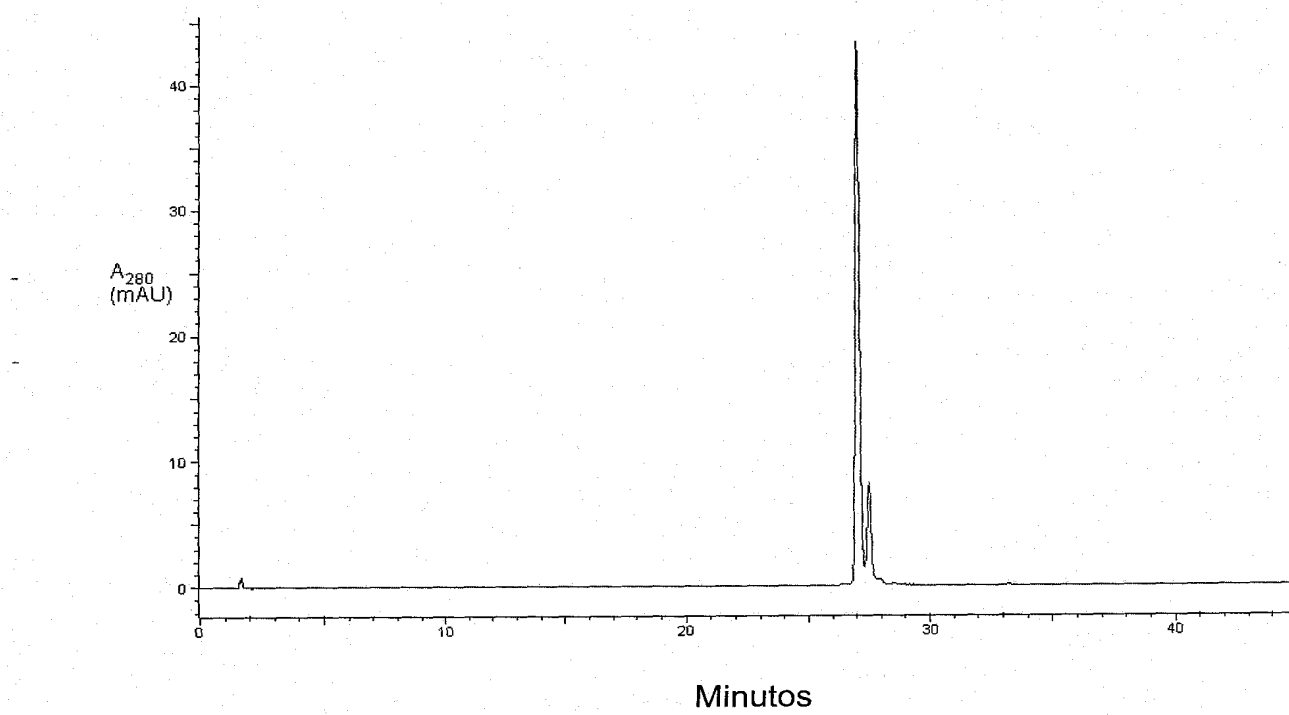


FIG. 18

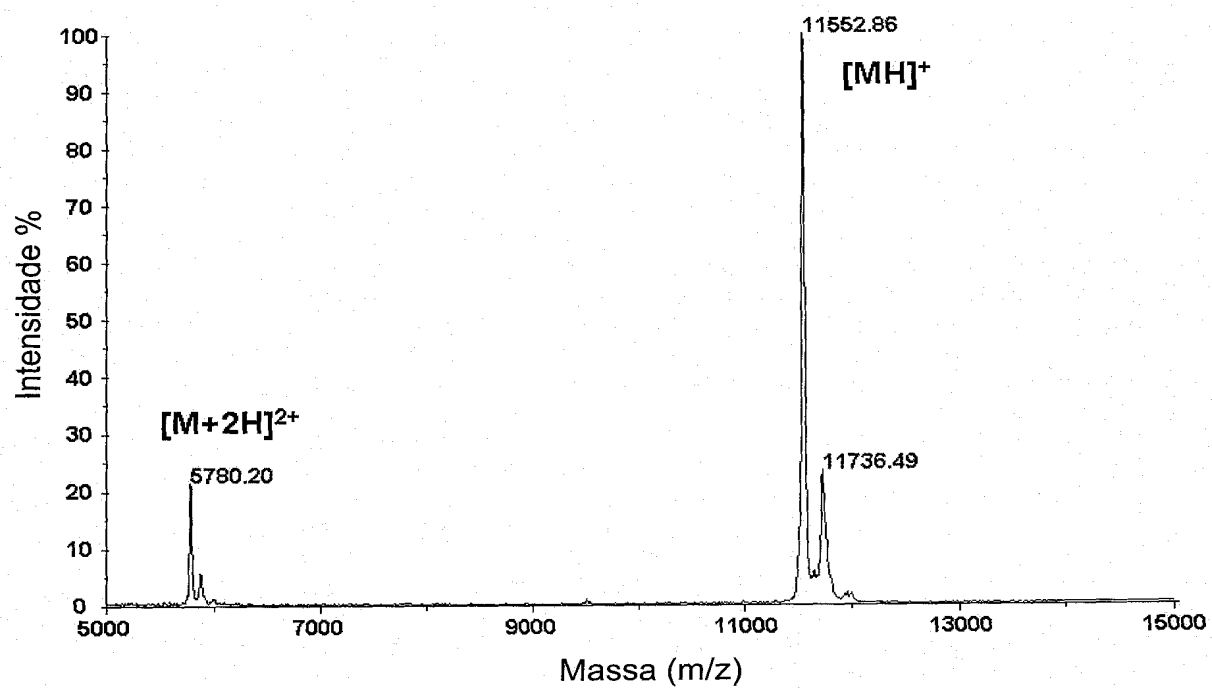
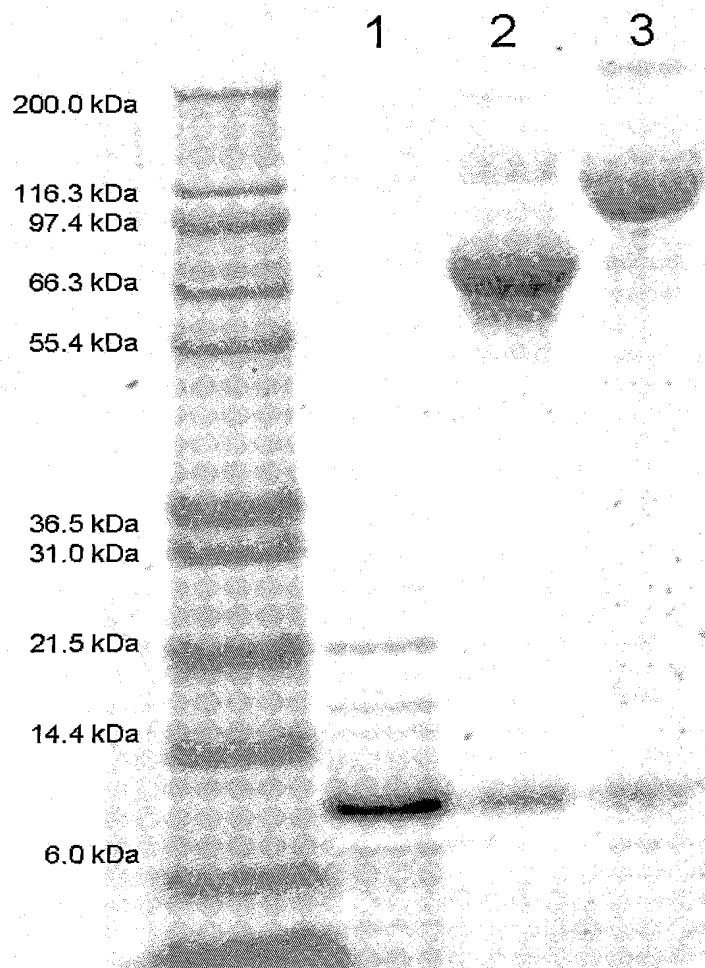


FIG. 19



1: 385A08
2: 385A08-PEG20-385A08
3: 385A08-PEG40

FIG. 20

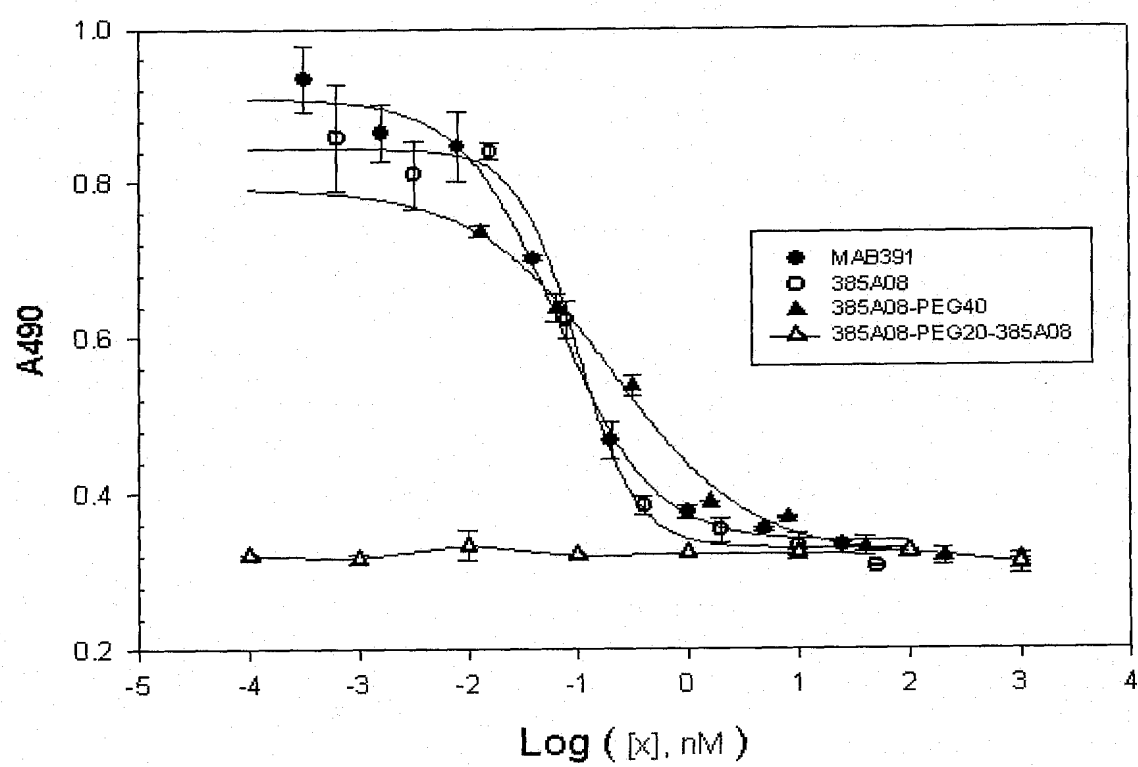


FIG. 21

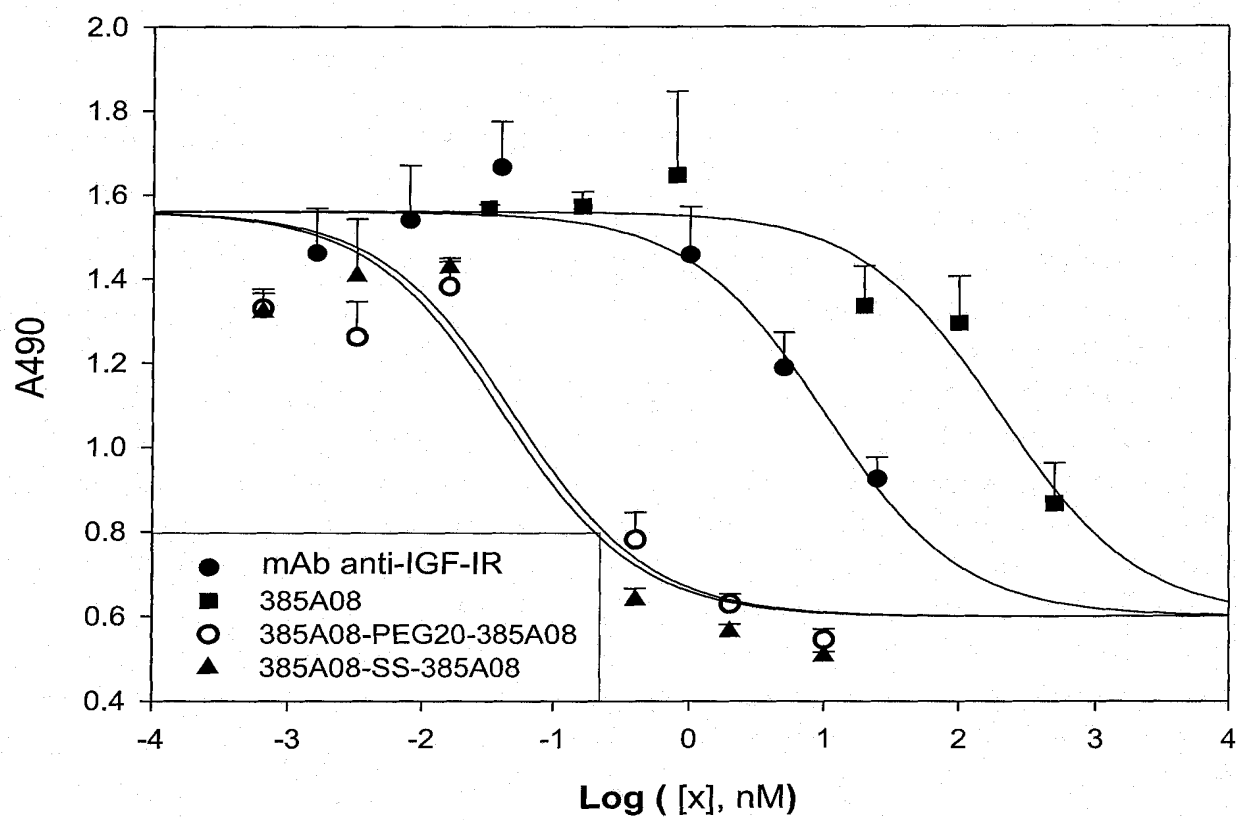
32D:IGF-IR Ensaio de proliferação

FIG. 22

NCI-H929 Ensaio de proliferação

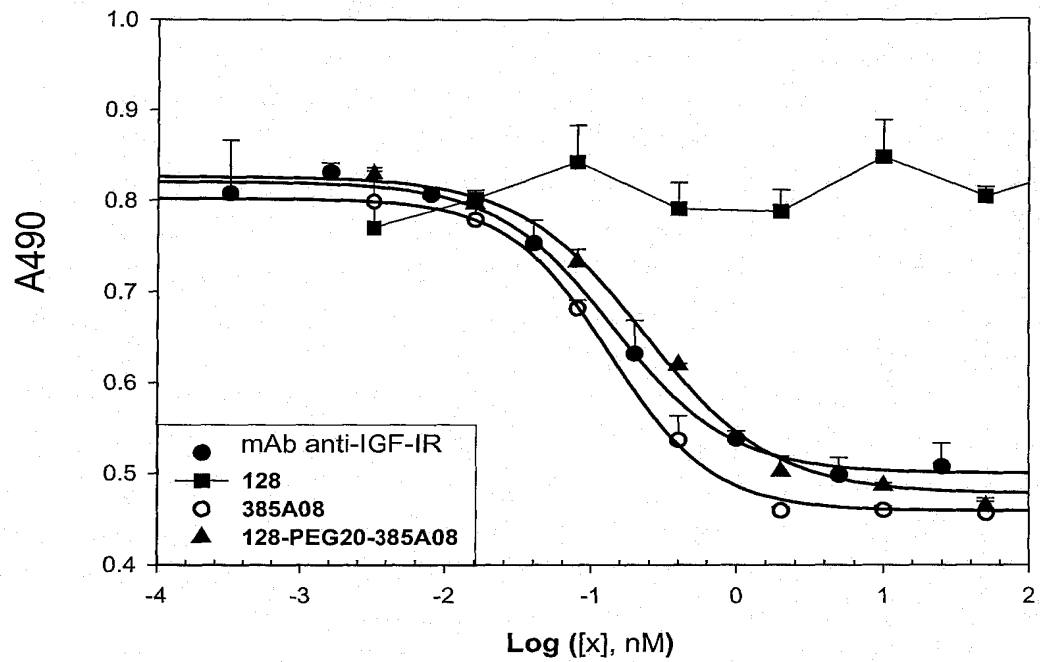


FIG. 23

hKE8-3 (Ba/F3:VEGFR2) Ensaio de proliferação

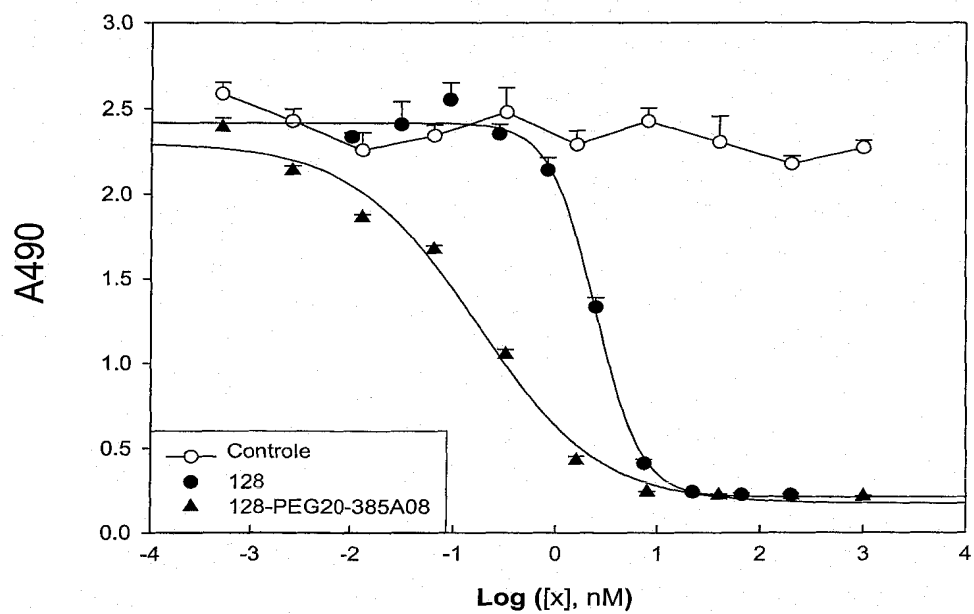


FIG. 24

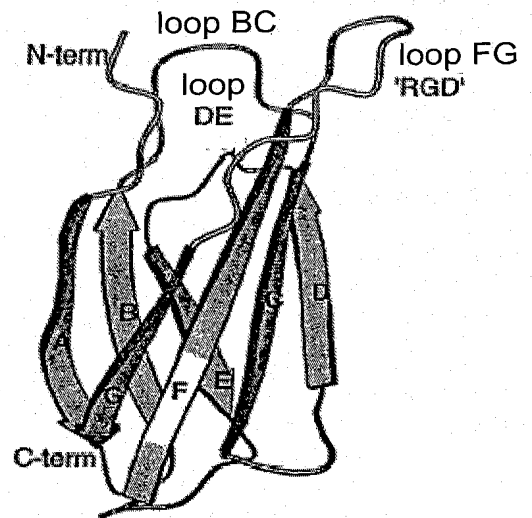
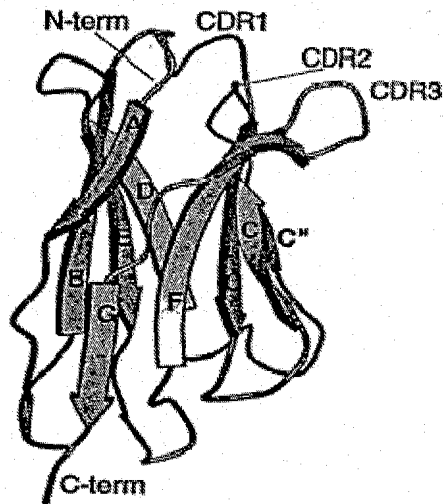
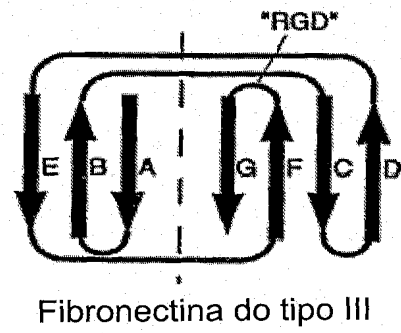
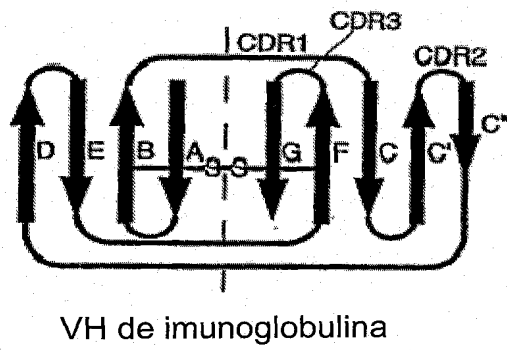


FIG. 25

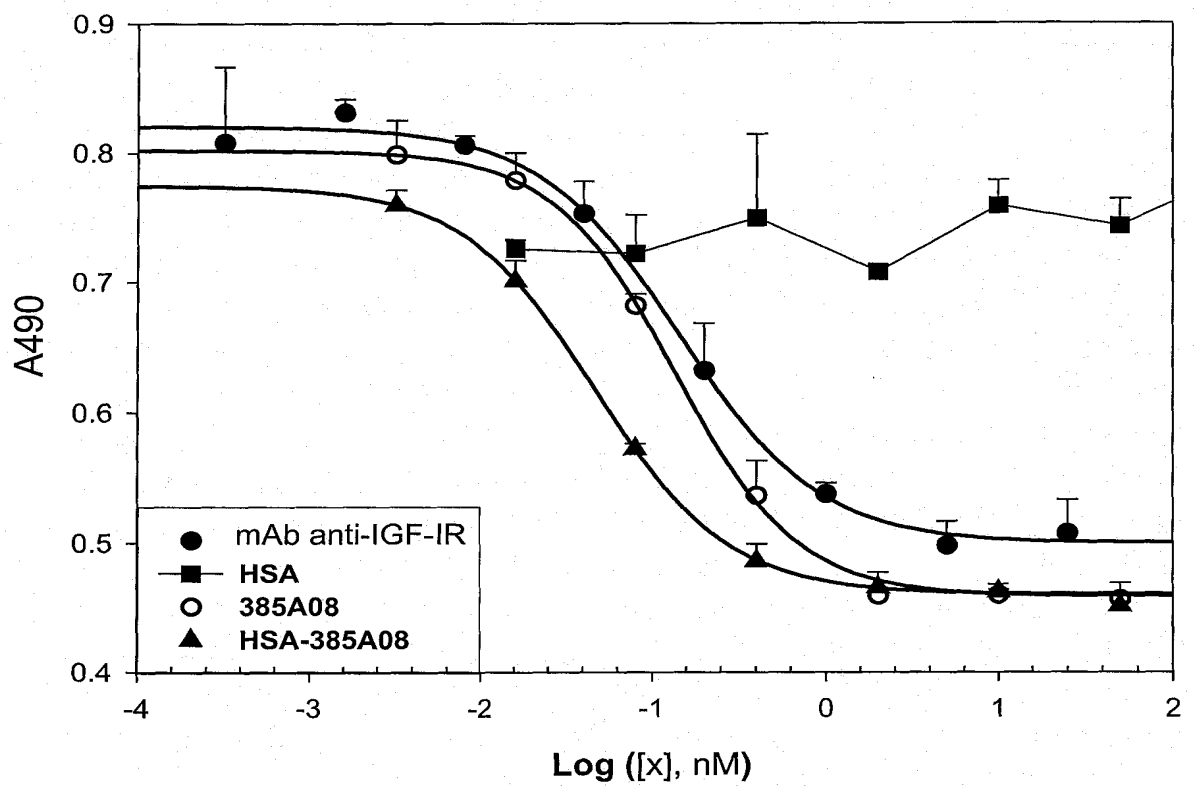
NCI-H929 Ensaio de proliferação

FIG. 26

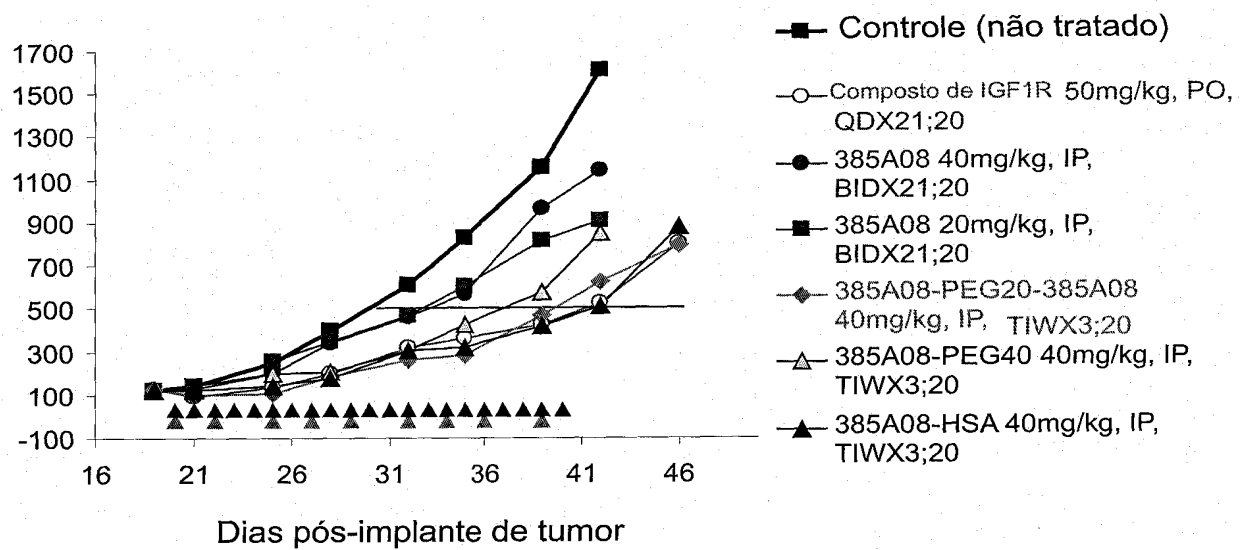


FIG. 27

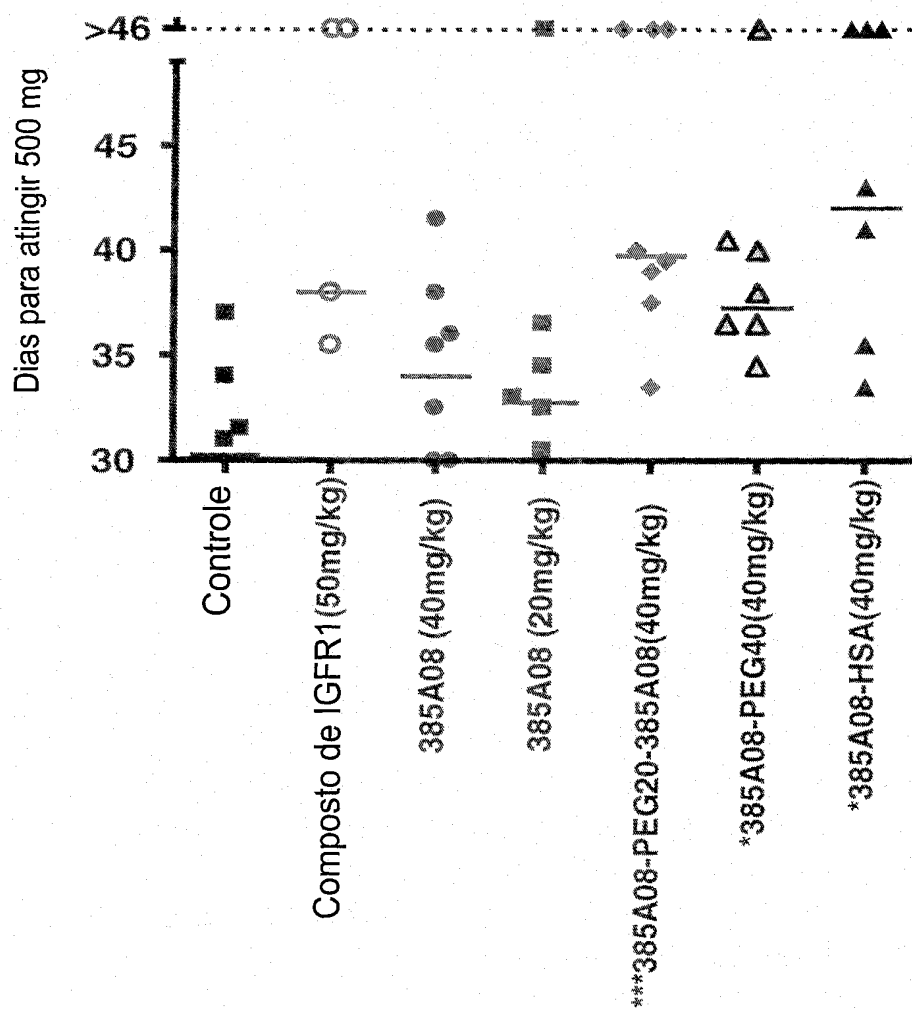


FIG. 28

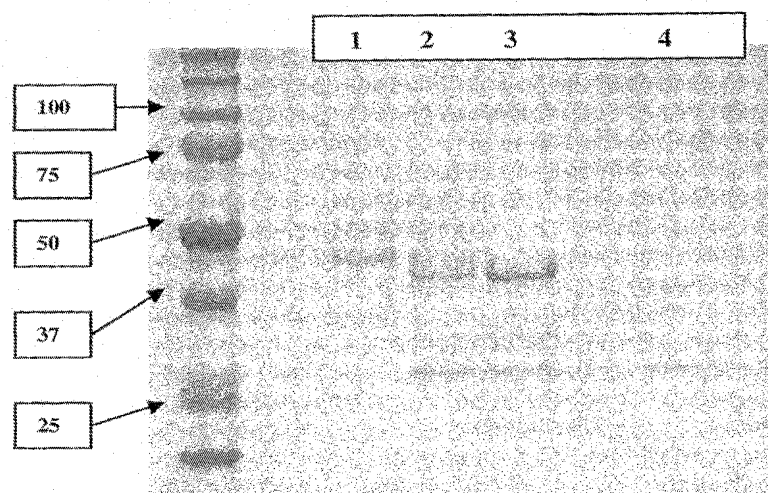
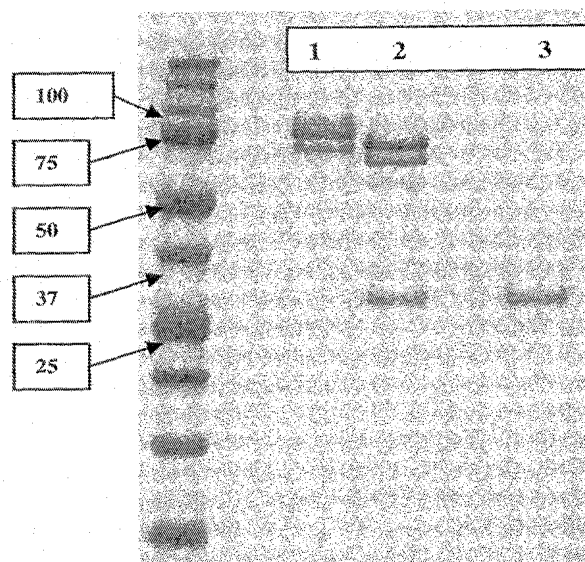
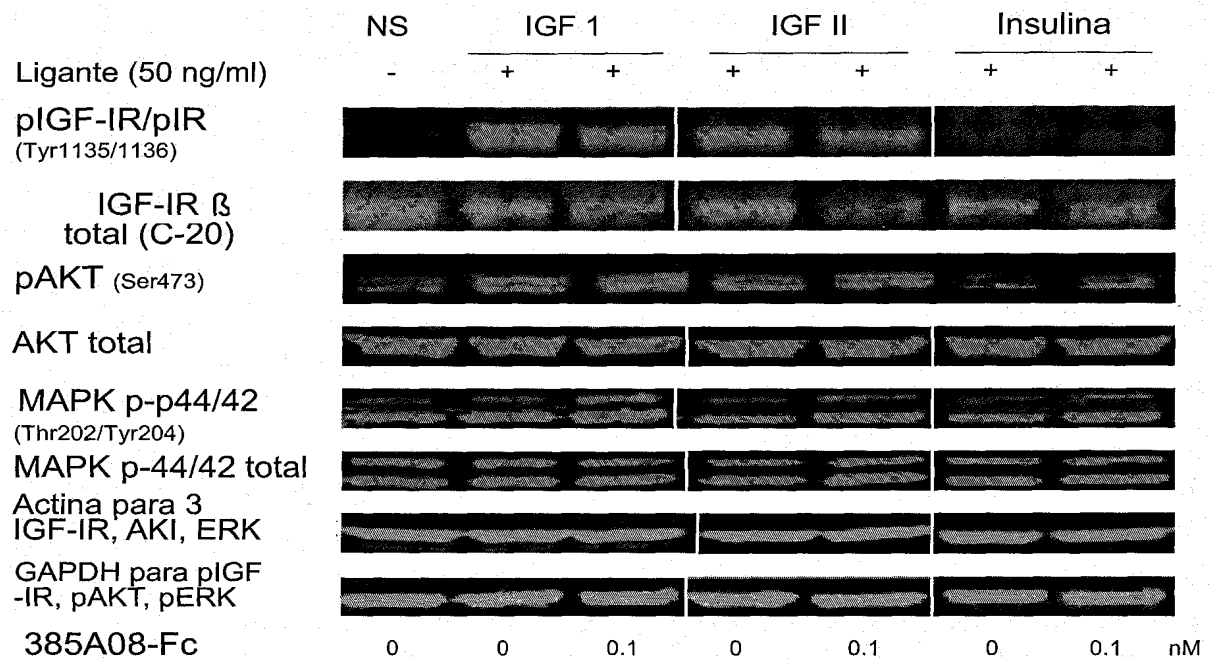


FIG. 29

Bioquímica de 385A08-Fc $\pm$ IGF-I / IGF-II / insulina em células Rh41



Células Rh41 foram tratadas com soro através de meio com BSA a 0,3% durante a noite, então, tratadas com 385A08-Fc durante 1 hora, estimulando com IGF-I/IGF-II/insulina (50 ng/ml) durante 5 min

FIG. 30

loop BC	loop DE	loop FG	SEQ ID NO:
VSDVPRDLEVVAATPTSLLSISWDAPAVYRYRITYGETGNSPVQEFVPSKSTATISGLKPGVDYTIIVYAVTGRGDSPASSKPIISINYRT			1.
VSDVPRDLEVVAATPTSLLSISWRARQNSRYRITYGETGNSPVQEFVPSKSTATISGLKPGVDYTIIVYAVTGVGDFMLGMLPISINYRT			2.
VSDVPRDLEVVAATPTSLLSISWLPQGVRYRITYGETGNSPVQEFVPSKSTATISGLKPGVDYTIIVYAVTSSNGFYSKILSAMPISINYRT			3.
VSDVPRDLEVVAATPTSLLSISWGPVGLSRYRITYGETGNSPVQEFVPSKSTATISGLKPGVDYTIIVYAVTGLPILHSGPISINYRT			4.
VSDVPRDLEVVAATPTSLLSISWIFPSYRYRITYGETGNSPVQEFVPSKSTATISGLKPGVDYTIIVYAVTLDHPSLWPIISINYRT			5.
VSDVPRDLEVVAATPTSLLSISWPHYKVARYYRITYGETGNSPVQEFVPSKSTATISGLKPGVDYTIIVYAVTDYKMKPRNYGPIISINYRT			6.
VSDVPRDLEVVAATPTSLLSISWSYESYKRYRITYGETGNSPVQEFVPSKSTATISGLKPGVDYTIIVYAVTEKGHYRILYAPISINYRT			7.
VSDVPRDLEVVAATPTSLLSISWGSHLVKRYRITYGETGNSPVQEFVPSKSTATISGLKPGVDYTIIVYAVTKRNYRPIISINYRT			8.
VSDVPRDLEVVAATPTSLLSISWAPYRVRYRITYGETGNSPVQEFVPSKSTATISGLKPGVDYTIIVYAVTKRNYGPIISINYRT			9.
VSDVPRDLEVVAATPTSLLSISWGSHLVKRYRITYGETGNSPVQEFVPSKSTATISGLKPGVDYTIIVYAVTKRNYGPIISINYRT			10.
VSDVPRDLEVVAATPTSLLSISWSVEAMDGRYYRITYGETGNSPVQEFVPSKSTATISGLKPGVDYTIIVYAVTKRNYGPIISINYRT			11.
VSDVPRDLEVVAATPTSLLSISWPHNODBRYRITYGETGNSPVQEFVPSKSTATISGLKPGVDYTIIVYAVTKRNYGPIISINYRT			12.
VSDVPRDLEVVAATPTSLLSISWIGLGLVRYRITYGETGNSPVQEFVPSKSTATISGLKPGVDYTIIVYAVTKRNYGPIISINYRT			13.
VSDVPRDLEVVAATPTSLLSISWVLEHRYRITYGETGNSPVQEFVPSKSTATISGLKPGVDYTIIVYAVTKRNYGPIISINYRT			14.
VSDVPRDLEVVAATPTSLLSISWPPYLRVRYRITYGETGNSPVQEFVPSKSTATISGLKPGVDYTIIVYAVTKRNYGPIISINYRT			15.
VSDVPRDLEVVAATPTSLLSISWGTHVQRYRITYGETGNSPVQEFVPSKSTATISGLKPGVDYTIIVYAVTKRNYGPIISINYRT			16.
VSDVPRDLEVVAATPTSLLSISWSPYLVRVRYRITYGETGNSPVQEFVPSKSTATISGLKPGVDYTIIVYAVTKRNYGPIISINYRT			17.
VSDVPRDLEVVAATPTSLLSISWEVRYPYRITYGETGNSPVQEFVPSKSTATISGLKPGVDYTIIVYAVTKRNYGPIISINYRT			18.
VSDVPRDLEVVAATPTSLLSISWTHFTVRYRITYGETGNSPVQEFVPSKSTATISGLKPGVDYTIIVYAVTKRNYGPIISINYRT			19.
VSDVPRDLEVVAATPTSLLSISWDHMPGGRYYRITYGETGNSPVQEFVPSKSTATISGLKPGVDYTIIVYAVTKRNYGPIISINYRT			20.
VSDVPRDLEVVAATPTSLLSISWYNOPRRRYRITYGETGNSPVQEFVPSKSTATISGLKPGVDYTIIVYAVTKRNYGPIISINYRT			21.
VSDVPRDLEVVAATPTSLLSISWGSGLVQRYRITYGETGNSPVQEFVPSKSTATISGLKPGVDYTIIVYAVTKRNYGPIISINYRT			22.
VSDVPRDLEVVAATPTSLLSISWYRSYKRYRITYGETGNSPVQEFVPSKSTATISGLKPGVDYTIIVYAVTKRNYGPIISINYRT			23.
VSDVPRDLEVVAATPTSLLSISWSPYLVRVRYRITYGETGNSPVQEFVPSKSTATISGLKPGVDYTIIVYAVTKRNYGPIISINYRT			24.
VSDVPRDLEVVAATPTSLLSISWNHILKVQRYRITYGETGNSPVQEFVPSKSTATISGLKPGVDYTIIVYAVTKRNYGPIISINYRT			25.
VSDVPRDLEVVAATPTSLLSISWSDTLVRVRYRITYGETGNSPVQEFVPSKSTATISGLKPGVDYTIIVYAVTKRNYGPIISINYRT			26.
VSDVPRDLEVVAATPTSLLSISWDNSFVQRYRITYGETGNSPVQEFVPSKSTATISGLKPGVDYTIIVYAVTKRNYGPIISINYRT			27.
VSDVPRDLEVVAATPTSLLSISWSSRLIVRYRITYGETGNSPVQEFVPSKSTATISGLKPGVDYTIIVYAVTKRNYGPIISINYRT			28.
VSDVPRDLEVVAATPTSLLSISWSSRLIVRYRITYGETGNSPVQEFVPSKSTATISGLKPGVDYTIIVYAVTKRNYGPIISINYRT			29.
VSDVPRDLEVVAATPTSLLSISWSSRLIVRYRITYGETGNSPVQEFVPSKSTATISGLKPGVDYTIIVYAVTKRNYGPIISINYRT			30.
VSDVPRDLEVVAATPTSLLSISWSSRLIVRYRITYGETGNSPVQEFVPSKSTATISGLKPGVDYTIIVYAVTKRNYGPIISINYRT			31.
VSDVPRDLEVVAATPTSLLSISWSSRLIVRYRITYGETGNSPVQEFVPSKSTATISGLKPGVDYTIIVYAVTKRNYGPIISINYRT			32.
VSDVPRDLEVVAATPTSLLSISWSSRLIVRYRITYGETGNSPVQEFVPSKSTATISGLKPGVDYTIIVYAVTKRNYGPIISINYRT			33.
VSDVPRDLEVVAATPTSLLSISWSSRLIVRYRITYGETGNSPVQEFVPSKSTATISGLKPGVDYTIIVYAVTKRNYGPIISINYRT			34.
VSDVPRDLEVVAATPTSLLSISWSSRLIVRYRITYGETGNSPVQEFVPSKSTATISGLKPGVDYTIIVYAVTKRNYGPIISINYRT			35.
VSDVPRDLEVVAATPTSLLSISWSSRLIVRYRITYGETGNSPVQEFVPSKSTATISGLKPGVDYTIIVYAVTKRNYGPIISINYRT			36.
VSDVPRDLEVVAATPTSLLSISWSSRLIVRYRITYGETGNSPVQEFVPSKSTATISGLKPGVDYTIIVYAVTKRNYGPIISINYRT			37.

VSDVPRDLEVAAATPTSLIISWNHUKVQRYRRIITVGETGGENSPVQEFVTPVTHSTATISGLKPGVDYTIITVAVTNVKGPRGYPISINRYT
38
VSDVPRDLEVAAATPTSLIISWSDVFPARYRRIITVGETGGENSPVQEFVTPAHSPTATISGLKPGVDYTIITVAVTFSMNRYNKPISINRYT
39
VSDVPRDLEVAAATPTSLIISWENNFVQRYRRIITVGETGGENSPVQEFVTPRYNATATISGLKPGVDYTIITVAVTKMRDARPISINRYT
40
VSDVPRDLEVAAATPTSLIISWPTQAVSNRYRRIITVGETGGENSPVQEFVTPAPNTATISGLKPGVDYTIITVAVTFMSGRLHAPISINRYT
41
VSDVPRDLEVAAATPTSLIISWYPSLIERYYRRIITVGETGGENSPVQEFVTPDLRLTATISGLKPGVDYTIITVAVTDKKSRYTHAPISINRYT
42
VSDVPRDLEVAAATPTSLIISWANDPRNRYRRIITVGETGGENSPVQEFVTPAVYPATISGLKPGVDYTIITVAVTIKGLIQVTHPISINRYT
43
VSDVPRDLEVAAATPTSLIISWANDPRNRYRRIITVGETGGENSPVQEFVTPSSXPATISGLKPGVDYTIITVAVTYSYLQVWHAPISINRYT
44
VSDVPRDLEVAAATPTSLIISWQYNTSGRYRRIITVGETGGENSPVQEFVTPASXPATISGLKPGVDYTIITVAVTERVAPVWHKPI SINRYT
45
VSDVPRDLEVAAATPTSLIISWYVPRVQRYRRIITVGETGGENSPVQEFVTPAQCPATISGLKPGVDYTIITVAVTLCKFPXYAPISINRYT
46
VSDVPRDLEVAAATPTSLIISWSYMKPHRYRRIITVGETGGENSPVQEFVTPSSYPATISGLKPGVDYTIITVAVTDBYMYRMHAPISINRYT
47
VSDVPRDLEVAAATPTSLIISWGTRELVRYRRIITVGETGGENSPVQEFVTPRSVEPATISGLKPGVDYTIITVAVTINSLRRYGPI SINRYT
48
VSDVPRDLEVAAATPTSLIISWGTWRVARYRRIITVGETGGENSPVQEFVTPALGHTATISGLKPGVDYTIITVAVTFRNYGPI SINRYT
49
VSDVPRDLEVAAATPTSLIISWYLDTRDRYRRIITVGETGGENSPVQEFVTPPYPMATATISGLKPGVDYTIITVAVTESIQRRHRPISINRYT
50
VSDVPRDLEVAAATPTSLIISWAPYVARYRRIITVGETGGENSPVQEFVTPHNYPATATISGLKPGVDYTIITVAVTFRNYGPI SINRYT
51
VSDVPRDLEVAAATPTSLIISWYSEEDVARYRRIITVGETGGENSPVQEFVTPHNYPATATISGLKPGVDYTIITVAVTDPHGOYRKMSPISINRYT
52
VSDVPRDLEVAAATPTSLIISWQGEFTVARYRRIITVGETGGENSPVQEFVTPAYXPATATISGLKPGVDYTIITVAVTQNMHYLHXPISINRYT
53
VSDVPRDLEVAAATPTSLIISWGRVSKHRYRRIITVGETGGENSPVQEFVTPVPGHTATISGLKPGVDYTIITVAVTBEAPGIRPISINRYT
54
VSDVPRDLEVAAATPTSLIISWKKYXEMDRYRRIITVGETGGENSPVQEFVTPBAXSTATISGLKPGVDYTIITVAVTYDGPISINRYT
55
VSDVPRDLEVAAATPTSLIISWANDPOARNRYRRIITVGETGGENSPVQEFVTPAXYPATATISGLKPGVDYTIITVAVTYSYKYLHWPISINRYT
56
VSDVPRDLEVAAATPTSLIISWYDVKKRYRRIITVGETGGENSPVQEFVTPAXYPATATISGLKPGVDYTIITVAVTEHSHVRBMHVPISINRYT
57
VSDVPRDLEVAAATPTSLIISWASQVILCHRYRRIITVGETGGENSPVQEFVTPVPGXPATATISGLKPGVDYTIITVAVTKMRDARPISINRYT
58
VSDVPRDLEVAAATPTSLIISWGLDDYXGRYRRIITVGETGGENSPVQEFVTPGXPATATISGLKPGVDYTIITVAVTDSRLRYXHPISINRYT
59
VSDVPRDLEVAAATPTSLIISWRAVRVRYRRIITVGETGGENSPVQEFVTPANMFPATISGLKPGVDYTIITVAVTIPHYRNYKPI SINRYT
60
VSDVPRDLEVAAATPTSLIISWYVZAPARYRRIITVGETGGENSPVQEFVTPAHYPATATISGLKPGVDYTIITVAVTEKISYRIMHSPISINRYT
61
VSDVPRDLEVAAATPTSLIISWYMPHNRNYRRIITVGETGGENSPVQEFVTPASYPATATISGLKPGVDYTIITVAVTDONRYRYXHPISINRYT
62
VSDVPRDLEVAAATPTSLIISWTDAPHRRYRRIITVGETGGENSPVQEFVTPSSYPATATISGLKPGVDYTIITVAVTEKGLKILHWPISINRYT
63
VSDVPRDLEVAAATPTSLIISWAPYVARYRRIITVGETGGENSPVQEFVTPHNYPATATISGLKPGVDYTIITVAVTSPSLDRYPISINRYT
64
VSDVPRDLEVAAATPTSLIISWYPEYVNRNYRRIITVGETGGENSPVQEFVTPASYPATATISGLKPGVDYTIITVAVTQGVHYLYHSPISINRYT
65
VSDVPRDLEVAAATPTSLIISWHPDIPVARYRRIITVGETGGENSPVQEFVTPVNGTATISGLKPGVDYTIITVAVTSSMLYIQLEBPISINRYT
66
VSDVPRDLEVAAATPTSLIISWAHSGYSRYRRIITVGETGGENSPVQEFVTPESYPATATISGLKPGVDYTIITVAVTQKNTRYXHPISINRYT
67
VSDVPRDLEVAAATPTSLIISWDSHSSRYRRIITVGETGGENSPVQEFVTPESYPATATISGLKPGVDYTIITVAVTDKNTRYXHPISINRYT
68
VSDVPRDLEVAAATPTSLIISWHTVSDNRNYRRIITVGETGGENSPVQEFVTPATYFPATISGLKPGVDYTIITVAVTYKGHQIQYBPISINRYT
69
VSDVPRDLEVAAATPTSLIISWIEYSGSRRYRRIITVGETGGENSPVQEFVTPAHYPATATISGLKPGVDYTIITVAVTQSVIYVQKQAPISINRYT
70
VSDVPRDLEVAAATPTSLIISWSDYQSRVRYRRIITVGETGGENSPVQEFVTPAMYPTATISGLKPGVDYTIITVAVTACSWIRIMPISINRYT
71
VSDVPRDLEVAAATPTSLIISWGEFLEBARYYRRIITVGETGGENSPVQEFVTPDHSQATISGLKPGVDYTIITVAVTACSWIRIMPISINRYT
72
VSDVPRDLEVAAATPTSLIISWPKRPNMRYRRIITVGETGGENSPVQEFVTPSSAXYATISGLKPGVDYTIITVAVTYLALYXWHQPI SINRYT
73
VSDVPRDLEVAAATPTSLIISWYDQSRVRYRRIITVGETGGENSPVQEFVTPAMYPTATISGLKPGVDYTIITVAVTBRDYSYMMHHPISINRYT
74
VSDVPRDLEVAAATPTSLIISWEPQAVSNRYRRIITVGETGGENSPVQEFVTPAFENTATISGLKPGVDYTIITVAVTKVARDYPISINRYT
75
VSDVPRDLEVAAATPTSLIISWSDVFPARYRRIITVGETGGENSPVQEFVTPAHSPTATISGLKPGVDYTIITVAVTFSMNRYNKPISINRYT
76

FIG. 30 (CONT)

VSDVPRDLEVAATPTSLLSWEDHMRSRVYRITYGETGNSPVQEFVTPSYPTATISGLKPGVDYTTIVYAVTSGVQVHHPISINYRT 77.
 VSDVPRDLEVAATPTSLLSWAGYRMYRITYGETGNSPVQEFVTPGSYPTATISGLKPGVDYTTIVYAVTPRKHMYHHPISINYRT 78.
 VSDVPRDLEVAATPTSLLSWYMPHRMYRITYGETGNSPVQEFVTPSYPTATISGLKPGVDYTTIVYAVTHHVRHMBHPISINYRT 79.
 VSDVPRDLEVAATPTSLLSWHEDESTYRMYRITYGETGNSPVQEFVTPSYPTATISGLKPGVDYTTIVYAVTDEHLYHMBHPISINYRT 80.
 VSDVPRDLEVAATPTSLLSWDEIEFPYRMYRITYGETGNSPVQEFVTPGPRGTATISGLKPGVDYTTIVYAVTMEYLRWNPISINYRT 81.
 VSDVPRDLEVAATPTSLLSWSTHTFVSRMYRITYGETGNSPVQEFVTPKVNXTATISGLKPGVDYTTIVYAVTHSRPRHYHPISINYRT 82.
 VSDVPRDLEVAATPTSLLSWGHKIRVSRMYRITYGETGNSPVQEFVTPHNSVTATISGLKPGVDYTTIVYAVTVAYNLRDYPISINYRT 83.
 VSDVPRDLEVAATPTSLLSWESMLVQRYRITYGETGNSPVQEFVTPSSAVTATISGLKPGVDYTTIVYAVTPSHLRKYGCPISINYRT 84.
 VSDVPRDLEVAATPTSLLSWEDRSKRYRITYGETGNSPVQEFVTPASYPATISGLKPGVDYTTIVYAVTQDLYVYHPISINYRT 85.
 VSDVPRDLEVAATPTSLLSWDEHVAARYRITYGETGNSPVQEFVTPSENDTATISGLKPGVDYTTIVYAVTHLGLWLPISINYRT 86.
 VSDVPRDLEVAATPTSLLSWSELMRYKRYRITYGETGNSPVQEFVTPSNAMTATISGLKPGVDYTTIVYAVTSPSLRGYHPISINYRT 87.
 VSDVPRDLEVAATPTSLLSWAVDNRKRYRITYGETGNSPVQEFVTPSSYPTATISGLKPGVDYTTIVYAVTSKSGHYVHNPISINYRT 88.
 VSDVPRDLEVAATPTSLLSWLDLSLKMYRITYGETGNSPVQEFVTPSHQTATISGLKPGVDYTTIVYAVTEVAAYRMHHPISINYRT 89.
 VSDVPRDLEVAATPTSLLSWGLLGRDYYRITYGETGNSPVQEFVTPAFPTATISGLKPGVDYTTIVYAVTACEDTFFPNPISINYRT 90.
 VSDVPRDLEVAATPTSLLSWLPFAITRYRITYGETGNSPVQEFVTPDPLSTATISGLKPGVDYTTIVYAVTKRISTWPISINYRT 91.
 VSDVPRDLEVAATPTSLLSWYNNRQRYRITYGETGNSPVQEFVTPSYPTATISGLKPGVDYTTIVYAVTQOSCHAYHEHPISINYRT 92.
 VSDVPRDLEVAATPTSLLSWEEHAKDRYRITYGETGNSPVQEFVTPAEQGTATISGLKPGVDYTTIVYAVTEVAAYRMHHPISINYRT 93.
 VSDVPRDLEVAATPTSLLSWDEHFPVRYRITYGETGNSPVQEFVTPGPRGTATISGLKPGVDYTTIVYAVTMHLYLRWNPISINYRT 94.
 VSDVPRDLEVAATPTSLLSWSNXWKPORYRITYGETGNSPVQEFVTPSSYPTATISGLKPGVDYTTIVYAVTDRMYRLHHPISINYRT 95.
 VSDVPRDLEVAATPTSLLSWYEHIRGRYRITYGETGNSPVQEFVTPSSYPTATISGLKPGVDYTTIVYAVTSGQVYVYHSPISINYRT 96.
 VSDVPRDLEVAATPTSLLSWANDPRNRYYRITYGETGNSPVQEFVTPAVYPTATISGLKPGVDYTTIVYAVTYRASYQCHAPISINYRT 97.
 VSDVPRDLEVAATPTSLLSWYDHAQRYRITYGETGNSPVQEFVTPSTYPTATISGLKPGVDYTTIVYAVTVRGVYVYVYQHPISINYRT 98.
 VSDVPRDLEVAATPTSLLSWIPSKVGRYYRITYGETGNSPVQEFVTPSYPTATISGLKPGVDYTTIVYAVTEVCHYRTHAPISINYRT 99.
 VSDVPRDLEVAATPTSLLSWPTHVKVARYRITYGETGNSPVQEFVTPAVYPTATISGLKPGVDYTTIVYAVTEHSHVRMHVHPISINYRT 100.
 VSDVPRDLEVAATPTSLLSWLMKLVLEHYRITYGETGNSPVQEFVTPPSYPTATISGLKPGVDYTTIVYAVTYHESQEGAGHPISINYRT 101.
 VSDVPRDLEVAATPTSLLSWEXVETHRYRITYGETGNSPVQEFVTPAVHYTATISGLKPGVDYTTIVYAVTYMDTSMKVSSPISINYRT 102.
 VSDVPRDLEVAATPTSLLSWKYDSVSNRYRITYGETGNSPVQEFVTPSSYPTATISGLKPGVDYTTIVYAVTYQSYVYVHSPISINYRT 103.
 VSDVPRDLEVAATPTSLLSWEXDGPAGRYRITYGETGNSPVQEFVTPSSYPTATISGLKPGVDYTTIVYAVTQNNHLYHHPISINYRT 104.
 VSDVPRDLEVAATPTSLLSWYDDESKRYRITYGETGNSPVQEFVTPASYPATISGLKPGVDYTTIVYAVTQDLYVYHHPISINYRT 105.
 VSDVPRDLEVAATPTSLLSWYXMBHNRYYRITYGETGNSPVQEFVTPSYPTATISGLKPGVDYTTIVYAVTQNNHLYHHPISINYRT 106.
 VSDVPRDLEVAATPTSLLSWYSSHLPYDRYYRITYGETGNSPVQEFVTPKYKTATISGLKPGVDYTTIVYAVTKGHEVLPSPISINYRT 107.
 VSDVPRDLEVAATPTSLLSWQYDRSSYRYYRITYGETGNSPVQEFVTPASYPATISGLKPGVDYTTIVYAVTRGCHVQVXVHPISINYRT 108.
 VSDVPRDLEVAATPTSLLSWYTPKYSRYRITYGETGNSPVQEFVTPSHSTATISGLKPGVDYTTIVYAVTVGNMVLISVPPISINYRT 109.
 VSDVPRDLEVAATPTSLLSWSDSLKVSRYYRITYGETGNSPVQEFVTPQYHTATISGLKPGVDYTTIVYAVTPSNIIGRHNGPISINYRT 110.
 VSDVPRDLEVAATPTSLLSWSARLVARYRITYGETGNSPVQEFVTPKNSHTATISGLKPGVDYTTIVYAVTKMRDVPISINYRT 111.
 VSDVPRDLEVAATPTSLLSWSTALVQORYRITYGETGNSPVQEFVTPKNSHTATISGLKPGVDYTTIVYAVTKMRDVPISINYRT 112.
 VSDVPRDLEVAATPTSLLSWETHVKVARYRITYGETGNSPVQEFVTPKHTYATISGLKPGVDYTTIVYAVTTTGLRHYGHPISINYRT 113.
 VSDVPRDLEVAATPTSLLSWSDKT VQORYRITYGETGNSPVQEFVTPKHDRATISGLKPGVDYTTIVYAVTKMRDVPISINYRT 114.
 VSDVPRDLEVAATPTSLLSWSKRLQVSRYYRITYGETGNSPVQEFVTPNXYKTATISGLKPGVDYTTIVYAVTPSNIIGRHYGHPISINYRT 115

FIG. 30 (CONT)

VSDVPRDLEVVAATPTSLIISWSNRUWVKRYRRIITYGETGNSPVQEFVPHOMKATATISGLKPGVDYITIVYAVTGGYSGRNYGPISINYRT 116
 VSDVPRDLEVVAATPTSLIISWSENERVQRYRRIITYGETGNSPVQEFVPSVHTATISGLKPGVDYITIVYAVTKMPDYRPIISINYRT 117
 VSDVPRDLEVVAATPTSLIISWSSNUWVKRYRRIITYGETGNSPVQEFVPKDPSTATISGLKPGVDYITIVYAVTDYEMKPRNYGPISINYRT 118
 VSDVPRDLEVVAATPTSLIISWPTHYKVARYYRIITYGETGNSPVQEFVPKHESATISGLKPGVDYITIVYAVTLAVASREVRPIISINYRT 119
 VSDVPRDLEVVAATPTSLIISWPDHVAQRYRRIITYGETGNSPVQEFVPHQSRATISGLKPGVDYITIVYAVTTCGTERNYQPIISINYRT 120
 VSDVPRDLEVVAATPTSLIISWGSRLRVSRYYRIITYGETGNSPVQEFVPHYDSHTATISGLKPGVDYITIVYAVTQENRGRNYQPIISINYRT 121
 VSDVPRDLEVVAATPTSLIISWKKHVVQRYRRIITYGETGNSPVQEFVPHGHYATISGLKPGVDYITIVYAVTKMRDYRPIISINYRT 122
 VSDVPRDLEVVAATPTSLIISWITNLOVSRYYRIITYGETGNSPVQEFVPHKANTATISGLKPGVDYITIVYAVTSGKGRSYPISINYRT 123
 VSDVPRDLEVVAATPTSLIISWAEHLQVSRYYRIITYGETGNSPVQEFVPHRGVYATISGLKPGVDYITIVYAVTSGNIGRHIGPISINYRT 124
 VSDVPRDLEVVAATPTSLIISWQHLVQRYRRIITYGETGNSPVQEFVPHRGSPTATISGLKPGVDYITIVYAVTKMRDYRPIISINYRT 125
 VSDVPRDLEVVAATPTSLIISWRHPPHPTRYRRIITYGETGNSPVQEFVPLQPPATISGLKPGVDYITIVYAVTEGNERSLFIPISINYRT 126
 EVVAATPTSLIISWRHPPHPTRYRRIITYGETGNSPVQEFVPLQPPATISGLKPGVDYITIVYAVTEGNERSLFIPISINYRT 127
 GEVVAATPTSLIISWRHPPHPTRYRRIITYGETGNSPVQEFVPLQPPATISGLKPGVDYITIVYAVTDGRNRLLSIPISINYRT 128
 EVVAATPTSLIISWRHPPHPTRYRRIITYGETGNSPVQEFVPLQPPATISGLKPGVDYITIVYAVTDGRNRLLSIPISINYRT 129
 EVVAATPTSLIISWRHPPHPTRYRRIITYGETGNSPVQEFVPLQPPATISGLKPGVDYITIVYAVTMGLYGHLLPISINYRT 130
 EVVAATPTSLIISWRHPPHPTRYRRIITYGETGNSPVQEFVPLQPPATISGLKPGVDYITIVYAVTMGLYGHLLPISINYRT 131
 EVVAATPTSLIISWRHPPHPTRYRRIITYGETGNSPVQEFVPLQPPATISGLKPGVDYITIVYAVTMGLYGHLLPISINYRT 132
 EVVAATPTSLIISWRHPPHPTRYRRIITYGETGNSPVQEFVPLQPPATISGLKPGVDYITIVYAVTMGLYGHLLPISINYRT 133
 EVVAATPTSLIISWRHPPHPTRYRRIITYGETGNSPVQEFVPLQPPATISGLKPGVDYITIVYAVTMGLYGHLLPISINYRT 134
 EVVAATPTSLIISWRHPPHPTRYRRIITYGETGNSPVQEFVPLQPPATISGLKPGVDYITIVYAVTMGLYGHLLPISINYRT 135
 EVVAATPTSLIISWRHPPHPTRYRRIITYGETGNSPVQEFVPLQPPATISGLKPGVDYITIVYAVTMGLYGHLLPISINYRT 136
 EVVAATPTSLIISWRHPPHPTRYRRIITYGETGNSPVQEFVPLQPPATISGLKPGVDYITIVYAVTMGLYGHLLPISINYRT 137
 EVVAATPTSLIISWRHPPHPTRYRRIITYGETGNSPVQEFVPLQPPATISGLKPGVDYITIVYAVTMGLYGHLLPISINYRT 138
 EVVAATPTSLIISWRHPPHPTRYRRIITYGETGNSPVQEFVPLQPPATISGLKPGVDYITIVYAVTMGLYGHLLPISINYRT 139
 EVVAATPTSLIISWRHPPHPTRYRRIITYGETGNSPVQEFVPLQPPATISGLKPGVDYITIVYAVTMGLYGHLLPISINYRT 140
 EVVAATPTSLIISWRHPPHPTRYRRIITYGETGNSPVQEFVPLQPPATISGLKPGVDYITIVYAVTMGLYGHLLPISINYRT 141
 EVVAATPTSLIISWRHPPHPTRYRRIITYGETGNSPVQEFVPLQPPATISGLKPGVDYITIVYAVTMGLYGHLLPISINYRT 142
 EVVAATPTSLIISWRHPPHPTRYRRIITYGETGNSPVQEFVPLQPPATISGLKPGVDYITIVYAVTMGLYGHLLPISINYRT 143
 EVVAATPTSLIISWRHPPHPTRYRRIITYGETGNSPVQEFVPLQPPATISGLKPGVDYITIVYAVTMGLYGHLLPISINYRT 144
 VSDVPRDLEVVAATPTSLIISWRHPPHPTRYRRIITYGETGNSPVQEFVPLQPPATISGLKPGVDYITIVYAVTMGLYGHLLPISINYRT 145
 VSDVPRDLEVVAATPTSLIISWRHPPHPTRYRRIITYGETGNSPVQEFVPLQPPATISGLKPGVDYITIVYAVTMGLYGHLLPISINYRT 146
 EVVAATPTSLIISWRHPPHPTRYRRIITYGETGNSPVQEFVPLQPPATISGLKPGVDYITIVYAVTMGLYGHLLPISINYRT 147
 EVVAATPTSLIISWRHPPHPTRYRRIITYGETGNSPVQEFVPLQPPATISGLKPGVDYITIVYAVTMGLYGHLLPISINYRT 148
 EVVAATPTSLIISWRHPPHPTRYRRIITYGETGNSPVQEFVPLQPPATISGLKPGVDYITIVYAVTMGLYGHLLPISINYRT 149
 EVVAATPTSLIISWRHPPHPTRYRRIITYGETGNSPVQEFVPLQPPATISGLKPGVDYITIVYAVTMGLYGHLLPISINYRT 150
 EVVAATPTSLIISWRHPPHPTRYRRIITYGETGNSPVQEFVPLQPPATISGLKPGVDYITIVYAVTMGLYGHLLPISINYRT 151
 EVVAATPTSLIISWRHPPHPTRYRRIITYGETGNSPVQEFVPLQPPATISGLKPGVDYITIVYAVTMGLYGHLLPISINYRT 152
 EVVAATPTSLIISWRHPPHPTRYRRIITYGETGNSPVQEFVPLQPPATISGLKPGVDYITIVYAVTMGLYGHLLPISINYRT 153
 EVVAATPTSLIISWRHPPHPTRYRRIITYGETGNSPVQEFVPLQPPATISGLKPGVDYITIVYAVTMGLYGHLLPISINYRT 154

FIG. 30 (CONT)

EVVAATPTSLLSISWRHPHFPTTRYRITYGETGNSPVQEFVPLQPPATISGLKPGVDYITIGYAVTDGNGRLLNVPISINYRT 155
 EVVAATPTSLLSISWRHPHFPTTRYRITYGETGNSPVQEFVPLQPPATISGLKPGVDYITIGYAVTWHNGRELMTPI SINYRT 156
 EVVAATPTSLLSISWRHPHFPTTRYRITYGETGNSPVQEFVPLQPPATISGLKPGVDYITIGYAVTEWNGRVLMTPI SINYRT 157
 EVVAATPTSLLSISWRHPHFPTTRYRITYGETGNSPVQEFVPLQPPATISGLKPGVDYITIGYAVTVERNGHTLMTPI SINYRT 158
 EVVAATPTSLLSISWRHPHFPTTRYRITYGETGNSPVQEFVPLQPPATISGLKPGVDYITIGYAVTVEENGRLMTPI SINYRT 159
 EVVAATPTSLLSISWRHPHFPTTRYRITYGETGNSPVQEFVPLQPPATISGLKPGVDYITIGYAVTLERNGQVLFPI SINYRT 160
 EVVAATPTSLLSISWRHPHFPTTRYRITYGETGNSPVQEFVPLQPPATISGLKPGVDYITIGYAVTVERNGQVLYTPI SINYRT 161
 EVVAATPTSLLSISWRHPHFPTTRYRITYGETGNSPVQEFVPLQPPATISGLKPGVDYITIGYAVTWGKHELLIPISINYRT 162
 EVVAATPTSLLSISWRHPHFPTTRYRITYGETGNSPVQEFVPLQPPATISGLKPGVDYITIGYAVTLGRNDRELLTPI SINYRT 163
 EVVAATPTSLLSISWRHPHFPTTRYRITYGETGNSPVQEFVPLQPPATISGLKPGVDYITIGYAVTDGNDRLNIPISINYRT 164
 EVVAATPTSLLSISWRHPHFPTTRYRITYGETGNSPVQEFVPLQPPATISGLKPGVDYITIGYAVTFARDGHEILLTPI SINYRT 165
 EVVAATPTSLLSISWRHPHFPTTRYRITYGETGNSPVQEFVPLQPPATISGLKPGVDYITIGYAVTLEQNGRELMTPI SINYRT 166
 EVVAATPTSLLSISWRHPHFPTTRYRITYGETGNSPVQEFVPLQPPATISGLKPGVDYITIGYAVTVEENGRLVLTPI SINYRT 167
 EVVAATPTSLLSISWRHPHFPTTRYRITYGETGNSPVQEFVPLQPPATISGLKPGVDYITIGYAVTLENGRYLMVPI SINYRT 168
 EVVAATPTSLLSISWRHPHFPTTRYRITYGETGNSPVQEFVPLQPPATISGLKPGVDYITIGYAVTEGNGRELFIPI SINYRT 169
 VSDVPRDLEVAATPTSLLSISWRHPHFPTTRYRITYGETGNSPVQEFVPLQPPATISGLKPGVDYITIGYAVTWERNGRELFTPI SINYRT 170
 VSDVPRDLEVAATPTSLLSISWRHPHFPTTRYRITYGETGNSPVQEFVPLQPPATISGLKPGVDYITIGYAVTKERNGRELFTPI SINYRT 171
 VSDVPRDLEVAATPTSLLSISWRHPHFPTTRYRITYGETGNSPVQEFVPLQPPATISGLKPGVDYITIGYAVTTERGRELFTPI SINYRT 172
 VSDVPRDLEVAATPTSLLSISWRHPHFPTTRYRITYGETGNSPVQEFVPLQPPATISGLKPGVDYITIGYAVTKERSGRELFTPI SINYRT 173
 VSDVPRDLEVAATPTSLLSISWRHPHFPTTRYRITYGETGNSPVQEFVPLQPPATISGLKPGVDYITIGYAVTLERDRELFTPI SINYRT 174
 VSDVPRDLEVAATPTSLLSISWRHPHFPTTRYRITYGETGNSPVQEFVPLQPPATISGLKPGVDYITIG /VYAVTKERNGRELFTPI SINYRT 175
 VSDVPRDLEVAATPTSLLSISWRHPHFPTTRYRITYGETGNSPVQEFVPLQPPATISGLKPGVDYITIGYAVTWERNGRELFTPI SINYRT 176
 VSDVPRDLEVAATPTSLLSISWRHPHFPTTRYRITYGETGNSPVQEFVPLQPPATISGLKPGVDYITIGYAVTLERNDRELFTPI SINYRT 177
 MGEVVAATPTSLLSISWRHPHFPTTRYRITYGETGNSPVQEFVPLQPPATISGLKPGVDYITIGYAVTDGNGRLLSIPISINYTEIDKPSQ 178
 MGEVVAATPTSLLSISWRHPHFPTTRYRITYGETGNSPVQEFVPLQPPATISGLKPGVDYITIGYAVTDGNGRLLSIPISINYTEIDKPCQ 179
 MVSVDPRDLEVAATPTSLLSISWRHPHFPTTRYRITYGETGNSPVQEFVPLQPPATISGLKPGVDYITIGYAVTDGNGRLLSIPISINYTEIDKPSQ 180
 MGEVVAATPTSLLSISWRHPHFPTTRYRITYGETGNSPVQEFVPLQPPATISGLKPGVDYITIGYAVTDGNGRLLSIPISINYTEIDKPSQ 181
 MGEVVAATPTSLLSISWRHPHFPTTRYRITYGETGNSPVQEFVPLQPPATISGLKPGVDYITIGYAVTEGNGERSLFIPI SINYRT 182
 MVSVDPRDLEVAATPTSLLSISWRHPHFPTTRYRITYGETGNSPVQEFVPLQPPATISGLKPGVDYITIGYAVTEGNGERSLFIPI SINYRT 183
 VSDVPRDLEVAATPTSLLSISWRHPHFPTTRYRITYGETGNSPVQEFVPLQPPATISGLKPGVDYITIGYAVTRFRDQPI SINYRT 184
 VSDVPRDLEVAATPTSLLSISWRHPHFPTTRYRITYGETGNSPVQEFVPLQPPATISGLKPGVDYITIGYAVTRIRDYGIPI SINYRT 185
 VSDVPRDLEVAATPTSLLSISWRHPHFPTTRYRITYGETGNSPVQEFVPLQPPATISGLKPGVDYITIGYAVTAYRDQPI SINYRT 186
 VSDVPRDLEVAATPTSLLSISWRHPHFPTTRYRITYGETGNSPVQEFVPLQPPATISGLKPGVDYITIGYAVTRERDRPI SINYRT 187
 VSDVPRDLEVAATPTSLLSISWRHPHFPTTRYRITYGETGNSPVQEFVPLQPPATISGLKPGVDYITIGYAVTAVRDRPI SINYRT 188
 VSDVPRDLEVAATPTSLLSISWRHPHFPTTRYRITYGETGNSPVQEFVPLQPPATISGLKPGVDYITIGYAVTSLRDNVAPI SINYRT 189
 VSDVPRDLEVAATPTSLLSISWRHPHFPTTRYRITYGETGNSPVQEFVPLQPPATISGLKPGVDYITIGYAVTQLRDNVAPI SINYRT 190
 VSDVPRDLEVAATPTSLLSISWRHPHFPTTRYRITYGETGNSPVQEFVPLQPPATISGLKPGVDYITIGYAVTNLDRDNVAPI SINYRT 191
 VSDVPRDLEVAATPTSLLSISWRHPHFPTTRYRITYGETGNSPVQEFVPLQPPATISGLKPGVDYITIGYAVTNLDRDNVAPI SINYRT 192
 VSDVPRDLEVAATPTSLLSISWRHPHFPTTRYRITYGETGNSPVQEFVPLQPPATISGLKPGVDYITIGYAVTERRDRDNVAPI SINYRT 193

FIG. 30 (CONT)

VSDVPRDLEWAAATPTSLLSISWSARLKVARYIRITYGETGGNSPVQEFVTPKNVYTATISGLKPGVDYTIITVYAVTLVRNYGPI SINVRT 194
 VSDVPRDLEWAAATPTSLLSISWSARLKVARYIRITYGETGGNSPVQEFVTPKNVYTATISGLKPGVDYTIITVYAVTIRDYRPI SINVRT 195
 VSDVPRDLEWAAATPTSLLSISWSARLKVARYIRITYGETGGNSPVQEFVTPKNVYTATISGLKPGVDYTIITVYAVTLRLDYRPI SINVRT 196
 VSDVPRDLEWAAATPTSLLSISWSARLKVARYIRITYGETGGNSPVQEFVTPKNVYTATISGLKPGVDYTIITVYAVTLTRDYKPI SINVRT 197
 VSDVPRDLEWAAATPTSLLSISWSARLKVARYIRITYGETGGNSPVQEFVTPKNVYTATISGLKPGVDYTIITVYAVTVVRDYRPI SINVRT 198
 VSDVPRDLEWAAATPTSLLSISWSARLKVARYIRITYGETGGNSPVQEFVTPKNVYTATISGLKPGVDYTIITVYAVTSYRDYWPISINVRT 199
 VSDVPRDLEWAAATPTSLLSISWSARLKVARYIRITYGETGGNSPVQEFVTPKNVYTATISGLKPGVDYTIITVYAVTMSRDYGPISINVRT 200
 VSDVPRDLEWAAATPTSLLSISWSARLKVARYIRITYGETGGNSPVQEFVTPKNVYTATISGLKPGVDYTIITVYAVTSLRDYGPISINVRT 201
 VSDVPRDLEWAAATPTSLLSISWSARLKVARYIRITYGETGGNSPVQEFVTPKNVYTATISGLKPGVDYTIITVYAVTGVNRYGPI SINVRT 202
 GVSVDPRDLEWAAATPTSLLSISWSARLKVARYIRITYGETGGNSPVQEFVTPKNVYTATISGLKPGVDYTIITVYAVTRFRDYQPI SINVRT 226
 GVSVDPRDLEWAAATPTSLLSISWDAPAVTVRYIRITYGETGGNSPVQEFVTPGSKSTATISGLKPGVDYTIITGYAVTSGSGESPASSKPI SINVRT 227
 MKWVTFISLLFLFSSAYSRGVFRDRDAHSEVAHRFKDLGEENFKALVLIATAQYLOQCPFEDHVKL VNEVTEFAKTCVADESAENCDKSLHTLFGDKLCTVATLRETYGEMADCCA
 KOEPERNECFLOHKDDNPNLPRLVPRPEVDVMTAFHDNEETFLKKLYEIAIRRHYPFYAPPELLFFAKRYKAAFTTECCQAADKAAACLLPKLDELDRDEGKASSAKQRLKCASLQKFGE
 RAFKAWAVARLSQRFPAEAEVSKLVTDLT KVHTCECHGDLLECADRADLAKYICENQDSISSKLKECCEKPLLEKSHCIAEVENDEMPADLPSLAADFVESKDVCKNYAEAKD
 VFLGMFLYEVARRHPDYSVWLLRLAKTYETTTLEKCCAAADPHECYAKVDFEFKPLVEEPQNLIKONCELFEQLGEYKFNALLVRYTKKVPQVSTPTLVEVSRNLGKVGSKCKKH
 PEAKRMPCAEDYLSVVLNQLCVLHEKTPVSDRVT KCCTESLVNRRPCFSALEVDETYVPKEFNAETFFHADICTLSEKERQIKKQTALELVKHKPKATKEQLKAVMDDFAAFVE
 KCCKADDKETCFAEEGKKLVAASQAALGLPSTSTSTGVSVDPRDLEWAAATPTSLLSISWSARLKVARYIRITYGETGGNSPVQEFVTPKNVYTATISGLKPGVDYTIITVYAVTRFR
 DYQPI SINVRT 228
 MGVSVDPRDLEWAAATPTSLLSISWSARLKVARYIRITYGETGGNSPVQEFVTPKNVYTATISGLKPGVDYTIITVYAVTRFRDYQPI SINVRTPTSTSTSTAHKSEVAHRFKDLGEEN
 FKALVLIATAQYLOQCPFEDHVKL VNEVTEFAKTCVADESAENCDKSLHTLFGDKLCTVATLRETYGEMADCCA KOEPERNECFLOHKDDNPNLPRLVPRPEVDVMTAFHDNEETFL
 LKKLYEIAIRRHYPFYAPPELLFFAKRYKAAFTTECCQAADKAAACLLPKLDELDRDEGKASSAKQRLKASLQKFGERAFKAWAVARLSQRFPAEAEVSKLVTDLT KVHTCECHGDL
 LECADRADLAKYICENQDSISSKLKECCEKPLLEKSHCIAEVENDEMPADLPSLAADFVESKDVCKNYAEAKD VFLGMFLYEVARRHPDYSVWLLRLAKTYETTTLEKCCAAADP
 HECYAKVDFEFKPLVEEPQNLIKONCELFEQLGEYKFNALLVRYTKKVPQVSTPTLVEVSRNLGKVGSKCKKHPEAKRMPCAEDYLSVVLNQLCVLHEKTPVSDRVT KCCTESLV
 NRRPCFSALEVDETYVPKEFNAETFFHADICTLSEKERQIKKQTALELVKHKPKATKEQLKAVMDDFAAFVEKCCKADDKETCFAEEGKKLVAASQAALG 229
 MKWVTFISLLFLFSSAYSRGVFRDRDAHSEVAHRFKDLGEENFKALVLIATAQYLOQCPFEDHVKL VNEVTEFAKTCVADESAENCDKSLHTLFGDKLCTVATLRETYGEMADCCA
 KOEPERNECFLOHKDDNPNLPRLVPRPEVDVMTAFHDNEETFLKKLYEIAIRRHYPFYAPPELLFFAKRYKAAFTTECCQAADKAAACLLPKLDELDRDEGKASSAKQRLKASLQKFGE
 RAFKAWAVARLSQRFPAEAEVSKLVTDLT KVHTCECHGDLLECADRADLAKYICENQDSISSKLKECCEKPLLEKSHCIAEVENDEMPADLPSLAADFVESKDVCKNYAEAKD
 VFLGMFLYEVARRHPDYSVWLLRLAKTYETTTLEKCCAAADPHECYAKVDFEFKPLVEEPQNLIKONCELFEQLGEYKFNALLVRYTKKVPQVSTPTLVEVSRNLGKVGSKCKKH
 PEAKRMPCAEDYLSVVLNQLCVLHEKTPVSDRVT KCCTESLVNRRPCFSALEVDETYVPKEFNAETFFHADICTLSEKERQIKKQTALELVKHKPKATKEQLKAVMDDFAAFVE
 KCCKADDKETCFAEEGKKLVAASQAALGLEIDKPSQGVSDVPRDLEWAAATPTSLLSISWSARLKVARYIRITYGETGGNSPVQEFVTPKNVYTATISGLKPGVDYTIITVYAVTRFR
 DYQPI SINVRT 230
 MKWVTFISLLFLFSSAYSRGVFRDRDAHSEVAHRFKDLGEENFKALVLIATAQYLOQCPFEDHVKL VNEVTEFAKTCVADESAENCDKSLHTLFGDKLCTVATLRETYGEMADCCA
 KOEPERNECFLOHKDDNPNLPRLVPRPEVDVMTAFHDNEETFLKKLYEIAIRRHYPFYAPPELLFFAKRYKAAFTTECCQAADKAAACLLPKLDELDRDEGKASSAKQRLKASLQKFGE
 RAFKAWAVARLSQRFPAEAEVSKLVTDLT KVHTCECHGDLLECADRADLAKYICENQDSISSKLKECCEKPLLEKSHCIAEVENDEMPADLPSLAADFVESKDVCKNYAEAKD
 VFLGMFLYEVARRHPDYSVWLLRLAKTYETTTLEKCCAAADPHECYAKVDFEFKPLVEEPQNLIKONCELFEQLGEYKFNALLVRYTKKVPQVSTPTLVEVSRNLGKVGSKCKKH
 PEAKRMPCAEDYLSVVLNQLCVLHEKTPVSDRVT KCCTESLVNRRPCFSALEVDETYVPKEFNAETFFHADICTLSEKERQIKKQTALELVKHKPKATKEQLKAVMDDFAAFVE
 KCCKADDKETCFAEEGKKLVAASQAALGLSGSGSGSGVSDVPRDLEWAAATPTSLLSISWSARLKVARYIRITYGETGGNSPVQEFVTPKNVYTATISGLKPGVDYTIITVYAVT
 RFRDYQPI SINVRT 231

FIG. 30 (CONT)

MKWTFISLLFSSAYSRGVFRDRAHSEVAHRFKDLGEENFKALVLIAPQYLQOCPPFEDHVKLVNEVTEFAKTCVADESAENCDKSLHTLFGDKLCTVATLRETYGEMADCCA
 KQEPERNECFLOHKDDNPNLRLVRPEVDMCTAFHDNEETFLKKYLIEIARRHPYFAPPELLFFAKRYKAAFTTECCQAADKAACLLPKLDELDEGKASSAKQRLKASLQKFGE
 RAFKAWAVARLSQRPKAEFAEVSCLVTLTKVHTECCHGDLLECAADDRADLAKYICENQDSISSKLKECKEPLLEKSHCIAEVENDEMPADLPSLAADFVESKDVCKNYAEAKD
 VFLGMFLYEYARRHPDYSVLLRLAKTYETTLKCCAAADPHECYAKVDFEFKPIVEEPQNLIKONCELFEQLGKFKQNALLVRYTKVPQVSTPTLVEVSRNLGVSKCKCKH
 PEAKRMPCAEDYLSVNLQCVLHEKTPVSDRVTKCTESLVNRRPCFSALEVDYTVPKFEFNAETTFHADICTLSEKERQIKKQATLVELVKHKPKATKEQLKAVMDDFAAAFVE
 KCCKADDKETCFAEFGKLVAAQAALGLSGSGSGSGSGSDVPRDLEVAATPTLSLISWSARLKVARYYRITYGETGNSPVQEFVTPKNVYATISGLKPGVDYTIIVYAVTRFRDYQPI SINVRT
 DYTITVAVTRFRDYQPI SINVRT

232

MGVSDVPRDLEVAATPTLSLISWSARLKVARYYRITYGETGNSPVQEFVTPKNVYATISGLKPGVDYTIIVYAVTRFRDYQPI SINRTEIDKPSQAHKSEVAHRFKDLGEEN
 FKALVLIAPQYLQOCPPFEDHVKLVNEVTEFAKTCVADESAENCDKSLHTLFGDKLCTVATLRETYGEMADCCAQEPERNECFLOHKDDNPNLRLVRPEVDMCTAFHDNEETFL
 LKKYLIEIARRHPYFAPPELLFFAKRYKAAFTTECCQAADKAACLLPKLDELDEGKASSAKQRLKASLQKFGERAFKAWAVARLSQRPKAEFAEVSCLVTLTKVHTECCHGDL
 LECAADDRADLAKYICENQDSISSKLKECKEPLLEKSHCIAEVENDEMPADLPSLAADFVESKDVCKNYAEAKDVLGMFLYEYARRHPDYSVLLRLAKTYETTLKCCAAADP
 HECYAKVDFEFKPIVEEPQNLIKONCELFEQLGKFKQNALLVRYTKVPQVSTPTLVEVSRNLGVSKCKCKHPEAKRMPCAEDYLSVNLQCVLHEKTPVSDRVTKCTESLV
 NRRPCFSALEVDYTVPKFEFNAETTFHADICTLSEKERQIKKQATLVELVKHKPKATKEQLKAVMDDFAAAFVEKCCKADDKETCFAEFGKLVAAQAALG

233

MGVSDVPRDLEVAATPTLSLISWSARLKVARYYRITYGETGNSPVQEFVTPKNVYATISGLKPGVDYTIIVYAVTRFRDYQPI SINRTGSGSGSGSGSAHKSEVAHRFKDLG
 EENFKALVLIAPQYLQOCPPFEDHVKLVNEVTEFAKTCVADESAENCDKSLHTLFGDKLCTVATLRETYGEMADCCAQEPERNECFLOHKDDNPNLRLVRPEVDMCTAFHDNE
 ETFLKKYLIEIARRHPYFAPPELLFFAKRYKAAFTTECCQAADKAACLLPKLDELDEGKASSAKQRLKASLQKFGERAFKAWAVARLSQRPKAEFAEVSCLVTLTKVHTECCH
 GDLECAADDRADLAKYICENQDSISSKLKECKEPLLEKSHCIAEVENDEMPADLPSLAADFVESKDVCKNYAEAKDVLGMFLYEYARRHPDYSVLLRLAKTYETTLKCCAA
 ADPHECYAKVDFEFKPIVEEPQNLIKONCELFEQLGKFKQNALLVRYTKVPQVSTPTLVEVSRNLGVSKCKCKHPEAKRMPCAEDYLSVNLQCVLHEKTPVSDRVTKCTE
 SLVNRPCFSALEVDYTVPKFEFNAETTFHADICTLSEKERQIKKQATLVELVKHKPKATKEQLKAVMDDFAAAFVEKCCKADDKETCFAEFGKLVAAQAALG

234

MGVSDVPRDLEVAATPTLSLISWSARLKVARYYRITYGETGNSPVQEFVTPKNVYATISGLKPGVDYTIIVYAVTRFRDYQPI SINRTGSGSGSGSGSGSAHKS
 EVAHRFKDLGEENFKALVLIAPQYLQOCPPFEDHVKLVNEVTEFAKTCVADESAENCDKSLHTLFGDKLCTVATLRETYGEMADCCAQEPERNECFLOHKDDNPNLRLVRPEVD
 VMCTAFHDNEETFLKKYLIEIARRHPYFAPPELLFFAKRYKAAFTTECCQAADKAACLLPKLDELDEGKASSAKQRLKASLQKFGERAFKAWAVARLSQRPKAEFAEVSCLVTL
 LTKVHTECCHGDLLECAADDRADLAKYICENQDSISSKLKECKEPLLEKSHCIAEVENDEMPADLPSLAADFVESKDVCKNYAEAKDVLGMFLYEYARRHPDYSVLLRLAKTY
 ETTLEKCCAAADPHECYAKVDFEFKPIVEEPQNLIKONCELFEQLGKFKQNALLVRYTKVPQVSTPTLVEVSRNLGVSKCKCKHPEAKRMPCAEDYLSVNLQCVLHEKTPV
 SDRVTKCTESLVNRRPCFSALEVDYTVPKFEFNAETTFHADICTLSEKERQIKKQATLVELVKHKPKATKEQLKAVMDDFAAAFVEKCCKADDKETCFAEFGKLVAAQAALG

235

MRLAVGALLVCAVLGLCLAVPDKTVRWCAVSEHEATKQCSFRDHMSVIPSDGPSVACVKKASYLDCIRAITAANEADAVTLDAGLVYDAYLAPNNLKPVAEFYGSKEDPOTFYA
 VAVVKDSGFQMNQLRGKKSCHTGLGRSAGWNIPIGLLYCDLPEPRKPLEKAVANFFSGSCAPCAGDTDFPQLCQLCPGCGCSTLNQFGYSGAFKCLKDGAGDVAFAVKHSTIFEN
 LANKADRDQYELLCLDNRKPKVDEYKDXLAQVPSHTTVARSMSGKEDLIWELLNQAQEHFGDKSKEFOLFSPPHGDLLLFKDSAHGFLKVPVPRMDAKMYLGYEYVTAIRNLREG
 TCPEAPTDCKPKVKWCSLHSHERLKCDEWSVNSVGKIECVSAETTEDCIAKIMNGEADAMSLDGGFVYIAGKCGLVPLVAENYKNSDNCEDTPEAGYFAVAVKKSASDLTWNLLK
 GKKSCHTAVGRTAGWNIPMGLLYNKINCHRFDEFFSEGCAPGSKKDSLLCKLWMSGLNCEPNNKEGYGYTGAFRCVLVEKGDVAFAVKHSTIFENLANKADRDQYELLCLDNRKPKVDEYKDXLAQVPSH
 LCLDGTGRKPEEYANCHLAPNHAVVTRKDEAKVHKILRQOQHLFGSNVTDCSGNFCFLFRSETKDLLFRDDTVCLAKLHNRNTYEKLYGEEYKAVGNLRCSTSSLLLEACTFR

236

RPPSTSTGSDVPRDLEVAATPTLSLISWSARLKVARYYRITYGETGNSPVQEFVTPKNVYATISGLKPGVDYTIIVYAVTRFRDYQPI SINVRT
 MGVSVDPRDLEVAATPTLSLISWSARLKVARYYRITYGETGNSPVQEFVTPKNVYATISGLKPGVDYTIIVYAVTRFRDYQPI SINRTPSTSTSTVDPKTVRWCAVSEHEAT
 KQCSFRDHMSVIPSDGPSVACVKKASYLDCIRAITAANEADAVTLDAGLVYDAYLAPNNLKPVAEFYGSKEDPOTFYFAVAVVKDSGFQMNQLRGKKSCHTGLGRSAGWNIPIG
 LLYCDLPEPRKPLEKAVANFFSGSCAPCAGDTDFPQLCQLCPGCGCSTLNQFGYSGAFKCLKDGAGDVAFAVKHSTIFENLANKADRDQYELLCLDNRKPKVDEYKDXLAQVPSH
 TVVARSMGKEDLIWELLNQAQEHFGDKSKEFOLFSPPHGDLLLFKDSAHGFLKVPVPRMDAKMYLGYEYVTAIRNLREGTCPEAPTDCKPKVKWCSLHSHERLKCDEWSVNSVGK
 IECVSAETTEDCIAKIMNGEADAMSLDGGFVYIAGKCGLVPLVAENYKNSDNCEDTPEAGYFAVAVVKKSASDLTWNLLKGRKKSCHTAVGRTAGWNIPMGLLYNKINCHRFDEFFS

FIG. 30 (CONT)

EGCAPGSKDSSLCKLIMGSGNLCEPNNKEGYGYTGAFCRLVEKGDVAFVKHQTVPQNTGGKNDPPWAKNLNEKDYELLCLDGTTRKPVVEYANCHLAPNHAHVTRKDKACV
 HKILRQOQHLFGSNVTDSCGNFCLFRSETKDLLFRDDTVCLAKLHNRNTYEKYLGEYVAVGNLRKCSSTSSLEACTFRP 237

MRLAVGALLVCAVLGLCLAVPDKTVRWCAVSEHEATKQSFDRDHMKSVIPSDGPSVACVKKASYLDICIRAIANEADAVTLDAGLVYDAYLAPNNLKPVAEYFGSKEDPQTFYYA
 VAVVKDSGFQMNQLRGKKSCHTGLRSAGWNIPIGLLYCDLPEPRKPLEKAVANFFSGCAPCADGTDFFQLCQLCPGCGCSTLNQYFGYSGAFKCLKDAGDVAFVVKHSTIFEN
 LANKADRDQYELLCLDNTRKPVDEYKDLAQVPSHTTVARSMSGKEDLIWELLNQAQEHFGKDSKEFQLFSSPHGKDLLFKDSAHGFLKVPPRMDAKMYLGYEVVTAIRNLREG
 TCPEAPTDCEKPVKWCALSHHERLKCDEWSVNSVGKIECVSAETTEDCIAKIMNGEADAMSLDGGFVYIAGKCGLVVLAENYKSDNCEDTPEAGYFAVAVVKKSASDLTWDNLK
 GKKSCHTAVGRTAGWNIPIGLLYNKNINCHRFDEFFSEGCAPGSKKDSLCKLIMGSGNLCEPNNKEGYGYTGAFCRLVEKGDVAFVKHQTVPQNTGGKNDPPWAKNLNEKDYEL
 LCLDGTTRKPVVEYANCHLAPNHAHVTRKDKACVHKILRQOQHLFGSNVTDSCGNFCLFRSETKDLLFRDDTVCLAKLHNRNTYEKYLGEYVAVGNLRKCSSTSSLEACTFR
 RPEIDKPSQGVSDVPRDLEVAATPTSLISWSARLKVARYYRITYGETGNSPVQEFVTPKNVYATISGLKPGVDYITITVAVTRFRDYQIPISINYRT 238

MRLAVGALLVCAVLGLCLAVPDKTVRWCAVSEHEATKQSFDRDHMKSVIPSDGPSVACVKKASYLDICIRAIANEADAVTLDAGLVYDAYLAPNNLKPVAEYFGSKEDPQTFYYA
 VAVVKDSGFQMNQLRGKKSCHTGLRSAGWNIPIGLLYCDLPEPRKPLEKAVANFFSGCAPCADGTDFFQLCQLCPGCGCSTLNQYFGYSGAFKCLKDAGDVAFVVKHSTIFEN
 LANKADRDQYELLCLDNTRKPVDEYKDLAQVPSHTTVARSMSGKEDLIWELLNQAQEHFGKDSKEFQLFSSPHGKDLLFKDSAHGFLKVPPRMDAKMYLGYEVVTAIRNLREG
 TCPEAPTDCEKPVKWCALSHHERLKCDEWSVNSVGKIECVSAETTEDCIAKIMNGEADAMSLDGGFVYIAGKCGLVVLAENYKSDNCEDTPEAGYFAVAVVKKSASDLTWDNLK
 GKKSCHTAVGRTAGWNIPIGLLYNKNINCHRFDEFFSEGCAPGSKKDSLCKLIMGSGNLCEPNNKEGYGYTGAFCRLVEKGDVAFVKHQTVPQNTGGKNDPPWAKNLNEKDYEL
 LCLDGTTRKPVVEYANCHLAPNHAHVTRKDKACVHKILRQOQHLFGSNVTDSCGNFCLFRSETKDLLFRDDTVCLAKLHNRNTYEKYLGEYVAVGNLRKCSSTSSLEACTFR
 RPSGSGSGSGVSDVPRDLEVAATPTSLISWSARLKVARYYRITYGETGNSPVQEFVTPKNVYATISGLKPGVDYITITVAVTRFRDYQIPISINYRT 239

MRLAVGALLVCAVLGLCLAVPDKTVRWCAVSEHEATKQSFDRDHMKSVIPSDGPSVACVKKASYLDICIRAIANEADAVTLDAGLVYDAYLAPNNLKPVAEYFGSKEDPQTFYYA
 VAVVKDSGFQMNQLRGKKSCHTGLRSAGWNIPIGLLYCDLPEPRKPLEKAVANFFSGCAPCADGTDFFQLCQLCPGCGCSTLNQYFGYSGAFKCLKDAGDVAFVVKHSTIFEN
 LANKADRDQYELLCLDNTRKPVDEYKDLAQVPSHTTVARSMSGKEDLIWELLNQAQEHFGKDSKEFQLFSSPHGKDLLFKDSAHGFLKVPPRMDAKMYLGYEVVTAIRNLREG
 TCPEAPTDCEKPVKWCALSHHERLKCDEWSVNSVGKIECVSAETTEDCIAKIMNGEADAMSLDGGFVYIAGKCGLVVLAENYKSDNCEDTPEAGYFAVAVVKKSASDLTWDNLK
 GKKSCHTAVGRTAGWNIPIGLLYNKNINCHRFDEFFSEGCAPGSKKDSLCKLIMGSGNLCEPNNKEGYGYTGAFCRLVEKGDVAFVKHQTVPQNTGGKNDPPWAKNLNEKDYEL
 LCLDGTTRKPVVEYANCHLAPNHAHVTRKDKACVHKILRQOQHLFGSNVTDSCGNFCLFRSETKDLLFRDDTVCLAKLHNRNTYEKYLGEYVAVGNLRKCSSTSSLEACTFR
 RPSGSGSGSGVSDVPRDLEVAATPTSLISWSARLKVARYYRITYGETGNSPVQEFVTPKNVYATISGLKPGVDYITITVAVTRFRDYQIPISINYRT 240

MGVSDVPRDLEVAATPTSLISWSARLKVARYYRITYGETGNSPVQEFVTPKNVYATISGLKPGVDYITITVAVTRFRDYQIPISINYRTIDKPSQVDPDKTVRWCAVSEHEAT
 KCQSFDRDHMKSVIPSDGPSVACVKKASYLDICIRAIANEADAVTLDAGLVYDAYLAPNNLKPVAEYFGSKEDPQTFYYAVAVVKKDSGFQMNQLRGKKSCHTGLRSAGWNIPIG
 LLYCDLPEPRKPLEKAVANFFSGCAPCADGTDFFQLCQLCPGCGCSTLNQYFGYSGAFKCLKDAGDVAFVVKHSTIFENLANKADRDQYELLCLDNTRKPVDEYKDLAQVPSH
 TVARSMSGKEDLIWELLNQAQEHFGKDSKEFQLFSSPHGKDLLFKDSAHGFLKVPPRMDAKMYLGYEVVTAIRNLREGTCPEAPTDCEKPVKWCALSHHERLKCDEWSVNSVGK
 IECVSAETTEDCIAKIMNGEADAMSLDGGFVYIAGKCGLVVLAENYKSDNCEDTPEAGYFAVAVVKKSASDLTWDNLKGGKKSCHTAVGRTAGWNIPIGLLYNKNINCHRFDEFFS
 EGCAPGSKDSSLCKLIMGSGNLCEPNNKEGYGYTGAFCRLVEKGDVAFVKHQTVPQNTGGKNDPPWAKNLNEKDYELLCLDGTTRKPVVEYANCHLAPNHAHVTRKDKACV
 HKILRQOQHLFGSNVTDSCGNFCLFRSETKDLLFRDDTVCLAKLHNRNTYEKYLGEYVAVGNLRKCSSTSSLEACTFRP 241

MGVSDVPRDLEVAATPTSLISWSARLKVARYYRITYGETGNSPVQEFVTPKNVYATISGLKPGVDYITITVAVTRFRDYQIPISINYRTSGSGSGSGVSDVDPDKTVRWCAVSEH
 EATKQSFDRDHMKSVIPSDGPSVACVKKASYLDICIRAIANEADAVTLDAGLVYDAYLAPNNLKPVAEYFGSKEDPQTFYYAVAVVKKDSGFQMNQLRGKKSCHTGLRSAGWNI
 PIGLLYCDLPEPRKPLEKAVANFFSGCAPCADGTDFFQLCQLCPGCGCSTLNQYFGYSGAFKCLKDAGDVAFVVKHSTIFENLANKADRDQYELLCLDNTRKPVDEYKDLAQV
 PSHTTVARSMSGKEDLIWELLNQAQEHFGKDSKEFQLFSSPHGKDLLFKDSAHGFLKVPPRMDAKMYLGYEVVTAIRNLREGTCPEAPTDCEKPVKWCALSHHERLKCDEWSVNS
 VGKIECVSAETTEDCIAKIMNGEADAMSLDGGFVYIAGKCGLVVLAENYKSDNCEDTPEAGYFAVAVVKKSASDLTWDNLKGGKKSCHTAVGRTAGWNIPIGLLYNKNINCHRFDE
 FFSEGCAPGSKKDSLCKLIMGSGNLCEPNNKEGYGYTGAFCRLVEKGDVAFVKHQTVPQNTGGKNDPPWAKNLNEKDYELLCLDGTTRKPVVEYANCHLAPNHAHVTRKDKACV
 ACVHKILRQOQHLFGSNVTDSCGNFCLFRSETKDLLFRDDTVCLAKLHNRNTYEKYLGEYVAVGNLRKCSSTSSLEACTFRP 242

FIG. 30 (CONT)

MGVSDVPRDLEVVAAATPTSLIISWSARLKVARYRITYGETGNSPVQEFVTPKNVYTATISGLKPGVDYTTVYAVTRFRDYQPI SINVRTGSGSGSGSGSGSGSVDPK
TVRWCAVSEHEATKCQSFRRDHMKSVIPSDGPSVACVKKASYLDCIRAI AANEADAVTLDAGLVYDAYLAPNNLKPVVAEFYGSKEDEPQTFYYAVAVVKD SGFQMNQLRGKKSCHT
GLGRSAGWNIPIGLLYCDLPEPRKPLEKAVANFFSGSCAPCADGTDPPQLCQLCPGCGCSTLNQYFGYSGAFKCLKDGAGDVAFVKHSTIFENLANKADRDQYELLCLDNTRKPV
EYKCHLAQVPSTTVARSMGGKEDLIWELLNQAQEHFGKDSKEFQLFSSPHGKDLLFKDSAHGFLKVPPRMDAKMYLGEYVTAIRNLREGTCPEAPTDECKPVKWCALSHHER
LKDEWSVNSVGKIECVSAETTEDCIAKIMNGEADAMSLDGGFVYIAGKCGLVPLAENYNKSDNCEDTPEAGYFAVAVVKKSASDLTWDNLKGKKSCHTAVGRTAGWNIPMGLLY
NKINCRFDEFFSEGCAPGSKDSSLCKLCMGSGLNLCENPNKRGYGYTGAFRCIVEKGDVAFVKKHQVTPQNTGGKNPDPWAKNLEKDYELLCLDGTGRKPVVEEVANCHLARAPN
HAVVTRKDKCAVCVHKILRQQQLFGSNVTDCSGNFCLFRSETKDLLFRDDTVCLAKLHDRNTYEKYLGEYVKA VGNLRKRCSTSSLLEACTFRRP 243

RESUMO

Patente de Invenção: **"PRODUTOS TERAPÊUTICOS OBJETIVADOS BASEADOS EM PROTEÍNAS MANIPULADAS PARA RECEPTORES DE QUINASES DE TIROSINA, INCLUINDO IGF-IR".**

- 5 A presente invenção refere-se a novas proteínas que se ligam ao receptor de fator-I de crescimento similar à insulina (IGF-IR), bem como outras proteína importantes. A invenção também proporciona novas proteínas em preparados farmacêuticos e derivados de tais proteínas e os usos das mesmas em aplicações diagnósticas, de pesquisa e terapêuticas. A invenção ainda proporciona células compreendendo tais proteínas, polinucleotídeo que codifica tais proteínas ou fragmentos dos mesmos e vetores compreendendo os polinucleotídeos que codificam as novas proteínas.
- 10