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

(21) PI 0809435-7 A2

(22) Data de Depósito: 26/03/2008
(43) Data da Publicação: 09/09/2014
(RPI 2279)

(51) Int.Cl.:
C12N 15/10
C07K 16/28
G01N 33/68
C12N 15/62

(54) Título: CONSTRUCTOS E BIBLIOTECAS QUE COMPREENDEM SEQUÊNCIAS DE CADEIA LEVE SUBSTITUIDA DE ANTICORPOS

(57) Resumo:

(30) Prioridade Unionista: 27/03/2007 US 60/920,568

(73) Titular(es): Sea Lane Biotechnologies, LLC

(72) Inventor(es): Lawrence Horowitz, Li Xu, Ramesh Bhatt

(74) Procurador(es): Dannemann ,Siemsen, Bigler & Ipanema Moreira

(86) Pedido Internacional: PCT US2008058283 de 26/03/2008

(87) Publicação Internacional: WO 2008/118970de 02/10/2008

Relatório Descritivo da Patente de Invenção para **"CONSTRUCTOS E BIBLIOTECAS QUE COMPREENDEM SEQUÊNCIAS DE CADEIA LEVE SUBSTITUTA DE ANTICORPOS".**

Campo da Invenção

A presente invenção refere-se o constructos e bibliotecas que compreendem sequências de cadeia leve substituta de anticorpos. Em particular, a invenção está relacionada o constructos que compreendem sequências VpreB, opcionalmente utilizadas como parceiras com outro polipeptídeo, tal como, por exemplo, sequências de domínios variáveis de cadeias pesadas de anticorpos e bibliotecas que contêm as mesmas.

Antecedentes da Invenção

Moléculas de anticorpo (Ig) produzidas por linfócitos B são constituídas de cadeias pesadas (H) e leves (L). As sequências de aminoácidos dos domínios amino terminais das cadeias H e L são variáveis (V_H e V_L), especialmente nas três regiões hipervariáveis (CDR1, CDR2, CDR3) que formam o sítio de combinação de antígenos. A montagem das cadeias H e L é estabilizada por uma ligação bissulfeto entre a região constante da cadeia L (C_L) e a primeira região constante da cadeia pesada (C_{H1}) e através de interações não-covalentes entre os domínios V_H e V_L.

Em seres humanos e muitos animais, tais como camundongos, os genes que codificam as cadeias H e L do anticorpo são montados em rearranjos somáticos em etapas de fragmentos gênicos que codificam ptécnicas das regiões V. Vários estágios do desenvolvimento de linfócitos B são caracterizados pelo status de rearranjo dos loci gênicos de Ig (vide, por exemplo, Melchers, F. & Rolink, A., B-Lymphocyte Development and Biology, Paul, W.E., ed., 1999, Lippincott, Filadélfia).

Os precursores de células B (pré-células B) foram identificados na medula óssea como linfócitos que produzem cadeias pesadas μ, mas ao invés das cadeias leves completamente desenvolvidas expressam um conjunto de genes específicos à linhagem B chamado VpreB(1-3) e λ5, respectivamente.

A isoforma principal da VpreB1 humana (CAG30495) é um poli

peptídeo de 145 aa de comprimento (SEQ ID NO: 1). Esta possui uma estrutura similar ao domínio V de Ig, mas não possui o última fita β (β7) de um domínio V típico e possui uma extremidade terminal carboxila que não exibe homologias de sequência com quaisquer outras proteínas. A VpreB2 possui várias isoformas, incluindo um polipeptídeo VpreB2 de camundongo de 142 aminoácidos (P13373; SEQ ID NO: 2) e uma variação de processamento de 171 aminoácidos de comprimento da sequência VpreB2 de camundongo (CAA01964l SEQ ID NO: 3). As sequências de VpreB1 e VpreB2 foram descritas na EP 0 269 127 e na Patente U.S. Nº 5.182.205; Collins e outros, Genome Biol. 5(10):R84 (2004); e Hollins e outros, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86(14):5552-5556 (1989). A isoforma principal da VpreB3 humana (SEQ ID NO: 4) é uma proteína de 123 aminoácidos de comprimento (CAG30496), descrita em Collins e outros, Genome Biol. 5(10):R84 (2004).

As VpreB(1-3) estão associadas de forma não-covalente com outra proteína, λ5. A λ5 humana é um polipeptídeo de 209 aminoácidos (CAA01962; SEQ ID NO: 5), que carrega uma estrutura similar ao domínio C de Ig com grandes homologias com as cadeias leves do anticorpo e, em direção a sua extremidade amino terminal, duas regiões funcionalmente distintas, das quais uma exibe grande homologia com a fita β7 dos domínios Vλ. Uma proteína similar à λ5 humana possui 213 aminoácidos (NP_064455; SEQ ID NO: 6) e exibe aproximadamente 84% de identidade de sequência com a região constante da cadeia leve de λ do anticorpo.

Para mais detalhes, vide os artigos de revisão a seguir: Karasuyama e outros, *Adv. Immunol.* 63:1-41 (1996); Melchers e outros, *Immunology Today* 14:60-68 (1993); e Melchers, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96:2571-2573 (1999).

Os polipeptídeos VpreB e λ5 formam juntos uma estrutura similar à cadeia leve de Ig associada de forma não-covalente, que é chamada de cadeia leve substituta ou pseudocadeia leve. Na superfície de pré-células B iniciais, a cadeia leve substituta está ligada por dissulfeto à cadeia pesada μ de Ig ligada à membrana em associação com um heterodímero CD79a/CD79b transdutor de sinal para formar uma estrutura similar ao re-

ceptor de células B, o assim chamado receptor pré-células B (preBCR).

Sumário da Invenção

Em um aspecto, a invenção está relacionada a polipeptídeos que compreendem uma sequência de VpreB ou uma sequência de λ5 conjugada a uma sequência de aminoácidos heterogênea, em que os polipeptídeos são capazes de se ligar a um alvo.

Em uma modalidade preferida, o polipeptídeo compreende uma sequência de VpreB, em que a VpreB pode ser qualquer VpreB nativa, incluindo a VpreB1 humana (SEQ ID NO: 1), a VpreB2 de camundongo (SEQ ID NO: 2 e 3) e a VpreB3 humana (SEQ ID NO: 4) ou um análogo das mesmas em outra espécie de mamífero ou um fragmento ou uma variação das mesmas, contanto que o polipeptídeo mantenha a capacidade de se ligar a um alvo.

Em uma modalidade preferida, a sequência de aminoácidos heterogênea é uma sequência de λ5, que pode ser qualquer sequência de λ5 nativa ou qualquer fragmento ou variação da mesma, incluindo a sequência de λ5 humana nativa da SEQ ID NO: 5, a sequência similar à λ5 humana da SEQ ID NO: 6 e fragmentos e variações das mesmas.

A sequência de VpreB e a sequência de aminoácidos heterogênea, por exemplo, a sequência de λ5, podem ser fundidas diretamente uma com a outra ou podem ser associadas de forma não-covalente. No primeiro caso, a fusão ocorre preferencialmente nas ou ao redor das regiões análogas de CDR3 de VpreB e λ5, respectivamente.

Em uma outra modalidade, a sequência de aminoácidos heterogênea é ou compreende uma sequência de região variável de cadeia leve de anticorpo. Em uma modalidade particular, a sequência de região variável de cadeia leve de anticorpo é fundida com a sequência de VpreB em um sítio análogo a uma região de CDR3 de cadeia leve de anticorpo. Em uma outra modalidade, a fusão ocorre entre a região de CDR3 de uma cadeia leve de anticorpo e a região análoga à CDR3 de uma VpreB. Em todas as modalidades, a cadeia leve de anticorpo pode ser uma cadeia λ ou uma cadeia κ.

Em modalidades particulares, os polipeptídeos apresentados

aqui, que incluem, sem limitação, conjugados de VpreB-λ5 (incluindo fusões, outra ligação covalente e associações não-covalentes) e conjugados de VpreB-cadeia leve de anticorpo, podem estar adicionalmente associados com uma sequência que compreende uma sequência de região variável de cadeia pesada de anticorpo, tal como uma região variável de cadeia pesada de anticorpo ou uma cadeia pesada completa de anticorpo, incluindo uma região variável.

Quando o polipeptídeo compreende uma sequência de λ5, a λ5 pode ser qualquer λ5 nativa, incluindo a λ5 humana da SEQ ID NO: 5 e a proteína similar a λ5 humana da SEQ ID NO: 6 ou um homólogo em outra espécie de mamífero ou qualquer fragmento ou variação dos mesmos, contanto que o polipeptídeo mantenha a capacidade de se ligar a um alvo. Em uma modalidade particular, a sequência de aminoácidos heterogênea conjugada com a sequência de λ5 é uma sequência de VpreB.

Nos constructos de polipeptídeos da presente invenção, as sequências de VpreB e de λ5, se estiverem ambas presentes, podem ser conjugadas através de quaisquer meios, incluindo a fusão direta, a ligação covalente por uma sequência ligante (por exemplo, um ligante peptídico) e a associação não-covalente.

Em uma modalidade particular, uma fusão de uma sequência de VpreB e uma sequência de λ5 é conjugada a uma sequência de cadeia pesada de anticorpo através da associação não-covalente, para formar um complexo dimérico.

Em uma outra modalidade, um complexo trimérico é formado através da associação não-covalente de uma sequência de VpreB, uma sequência de λ5 e uma sequência de cadeia pesada de anticorpo. Em certas modalidades, nestas estruturas, que também são referidas com estruturas de cadeia leve substitutas variantes de "variações de SURROBODY®", as caudas características (apêndices) de uma ou de ambas as ptécnicas de VpreB e λ5 podem ser (mas não precisam ser) mantidas. É possível ligar funcionalidades adicionais a tais apêndices. Em adição, em várias modalidades, as fusões benéficas com apêndices podem ser planejadas e produzidas com

a finalidade de melhorar várias propriedades dos constructos, tais como PK e/ou potência.

Em todas as modalidades, quando uma cadeia pesada de anticorpo que compreende sequências da região variável estiver presente, o polipeptídeo da presente invenção e as sequências de região variável de cadeia pesada de anticorpo podem ser ligar ao mesmo alvo ou a diferentes.

Em um outro aspecto, a invenção está relacionada a uma biblioteca de tais polipeptídeos.

Ainda em um outro aspecto, a invenção está relacionada a uma biblioteca de tais polipeptídeos associados com cadeias pesadas de anticorpo ou fragmentos dos mesmos que compreendem sequências da região variável.

Em um aspecto adicional, a invenção está relacionada a uma biblioteca que compreende uma coleção de sequências de cadeia leve substituta opcionalmente associada com sequências de região variável de cadeia pesada de anticorpo.

Em todos os aspectos, a biblioteca pode estar na forma de uma exibição, tal como, por exemplo, uma exibição em fagos, uma exibição bacteriana, uma exibição em leveduras, uma exibição de ribossomos, uma exibição de mRNA, uma exibição de DNA, uma exibição em células de mamífero, uma exibição em esporos, uma exibição viral, uma exibição baseada na ligação de proteína-DNA ou uma exibição em microesferas.

A invenção está relacionada ainda a vários usos de tais polipeptídeos e bibliotecas que contêm tais polipeptídeos, por exemplo, para planejar ou selecionar moléculas similares a anticorpos com especificidades de ligação e/ou afinidades de ligação desejadas, que possuem aplicações terapêuticas importantes.

Breve Descrição das figuras

A figura 1 mostra o alinhamento de VpreB1 humana (SEQ ID NO: 1) e λ5 humana com regiões variáveis e constantes da cadeia λ do anticorpo. A VpreB1 compartilha alguma similaridade de sequência com as regiões variáveis da cadeia λ do anticorpo, enquanto que λ5 compartilha alguma

similaridade com as regiões constantes da cadeia λ do anticorpo e a região estrutural 4. As regiões dentro de caixas identificam sequências de VpreB1 e λ5 que são similares às regiões estruturais de CDR1, CDR2 e CDR3 da cadeia λ do anticorpo, respectivamente.

A figura 2 é uma ilustração esquemática de uma cadeia leve substituta formada pelas sequências de VpreB e λ5, polipeptídeos de fusão ilustrativos que compreendem sequências de cadeia leve substituta e uma estrutura de cadeia leve de anticorpo derivadas da união V-J.

A figura 3 é uma ilustração esquemática de vários constructos de deleção e de cadeia isolada da cadeia leve substituta.

A figura 4 ilustra esquematicamente a incorporação de diversidade funcional combinatória nos constructos de cadeia leve substituta.

A figura 5 mostra as estruturas de genes e de proteínas de vários constructos de cadeia leve substituta ilustrativas.

A figura 6 é o alinhamento de sequências de VpreB1 com sequências da região variável da cadeia leve de λ5 do anticorpo. As regiões com o grau mais alto de similaridade de sequência estão dentro de caixas. Como mostrado na figura, VpreB1 exibe apenas 56%-62% (aminoácidos 2 até 97) de identidade de sequência com as sequências da linhagem germinativa da região variável da cadeia leve de λ5.

A figura 7 é o alinhamento de sequências de VpreB1 com sequências da região constante da cadeia leve de λ5 do anticorpo. Como mostrado na figura, as sequências de VpreB1 alinhadas exibem apenas 62% (aminoácidos 97 até 209) de identidade de sequência com as sequênicas da região constante da cadeia leve de λ5 do anticorpo correspondentes.

A figura 8 é o alinhamento de sequências de VpreB1 com sequências da região constante da cadeia leve κ do anticorpo. Como mostrado na figura, as sequências de VpreB1 alinhadas exibem apenas 35% (aminoácidos 105 até 209) de identidade de sequência com as sequências da região constante da cadeia leve κ do anticorpo correspondentes.

A figura 9 ilustra várias maneiras representativas de adicionar funcionalidade aos componentes de cadeia leve substituta (SLC).

A figura 10 mostra a sequência de VpreB1 humana da SEQ ID NO: 1; as sequências de VpreB2 de camundongo das SEQ ID NOS: 2 e 3; a sequência de VpreB3 humana da SEQ ID NO: 4, a sequência de λ5 humana da SEQ D NO: 5 e a sequência da proteína similar à λ5 humana da SEQ ID NO: 6 e sequências de vários constructos utilizados nos Exemplos.

A figura 11 ilustra vários constructos triméricos e diméricas de cadeia leve substituta da invenção.

Figura 12: Detecção de cadeias leves substitutas e cadeias pesadas conjugadas. Faixa 1: Comprimento Completo; Faixa 2: Lambda 5 dT; Faixa 3: VpreB dt; Faixa 4: Curtas; Faixa 5: fusão de SCL 1; Faixa 6: fusão de SLC 2; Faixa 7: Anticorpo.

Figura 13: as proteínas de fusão de SLC são expressas e bem secretadas dentro do periplasma de *E. coli* e são utilizadas melhor como parceiras com CH1 de cadeia pesada de IgG1 ao invés de IgM. Painel A: expressão de proteínas de fusão de SCL em *E. coli.* Painel B: parceiros da cadeia gama de IgG1 e é melhor purificada que a cadeia μ de IgM com uma fusão de SLC.

Figura 14: ELISA de captura de constructos de cadeia leve substituta em fagos através da detecção anti fago.

Figura 15: constructos de cadeia leve substituta purificado expressas em células de mamífero que se ligam ao alvo viral.

Figura 16: constructos de cadeia leve substituta purificadas expressas em células de mamífero que contém complexos estáveis que se ligam ao antígeno viral.

Figura 17: Ligação ao antígeno com lisados periplasmáticos de *E. coli.*

Figura 18: Fago com constructo de fusão de cadeia leve substituta pareado com cadeia pesada neutralizadora que se liga facilmente ao antígeno HA de H5.

Figura 19: Fago com constructo de cadeia leve substituta pareado com cadeia pesada neutralizadora que se liga ao antígeno.

Figura 20: Tabela que resume os resultados de experimentos de

exibição em fagos.

Figuras 21 e 22: Resultados da análise clonal dos ciclos 1 e 2 de fusões de cadeia leve substituta 1 e 2.

Descrição Detalhada da Invenção

A. Definições

A não ser que seja definido de outra maneira, os termos técnicos e científicos utilizados aqui possuem o mesmo significado que o comumente entendido por um versado na técnica à qual esta invenção pertence. Singleton e outros, *Dictionary of Microbiology and Molecular Biology* 2ª ed., J. Wiley & Sons (New York, NY 1994), fornecem a um versado na técnica um guia geral para muitos dos termos utilizados no presente pedido de patente.

Um versado na técnica reconhecerá muitos métodos e materiais similares ou equivalentes aos descritos aqui, que poderiam ser utilizados na prática da presente invenção. Na verdade, a presente invenção não é de forma alguma limitada pelos métodos e materiais descritos. Para as finalidades da presente invenção, os termos a seguir são definidos abaixo.

O termo "cadeia leve substituta", como utilizado aqui, refere-se a um dímero formado pela associação não-covalente de uma proteína VpreB e uma λ5.

O termo "VpreB" é utilizado aqui no sentido mais amplo e refere-se a qualquer polipeptídeo de sequência nativa ou variante de VpreB, incluindo especificamente, sem limitação, a VpreB1 humana da SEQ ID NO: 1, a VpreB2 de camundongo das SEQ ID NOS: 2 e 3, a VpreB3 humana da SEQ ID NO: 4 e isoformas, incluindo variações de processamento e variações formadas através de modificações pós-tradução, outros homólogos de mamífero das mesmas, bem como variações de tais polipeptídeos de sequência nativa.

O termo "λ5" é utilizado aqui no sentido mais amplo e refere-se ao polipeptídeo de sequência nativa ou variante de λ5, incluindo especificamente, sem limitação, a λ5 humana da SEQ ID NO: 5, a proteína similar à λ5 humana da SEQ ID NO: 6 e suas isoformas, incluindo variações de processamento e variações formadas através de modificações pós-tradução, outros

homólogos de mamífero das mesmas, bem como variações de tais polipeptídeos de sequência nativa.

Os termos "polipeptídeo VpreB variante" e "uma variante de um polipeptídeo VpreB" são utilizados de forma intercambiável e são definidos aqui como um polipeptídeo que difere de um polipeptídeo VpreB de sequência nativa em uma ou mais posições de aminoácidos como um resultado de uma modificação de aminoácido. O "polipeptídeo VpreB variante", como definido aqui, será diferente de uma sequência de cadeia leve λ ou κ de anticorpo nativa ou de um fragmento da mesma. O "polipeptídeo VpreB variante" irá preferencialmente manter pelo menos aproximadamente 65% ou pelo menos aproximadamente 70% ou pelo menos aproximadamente 75% ou pelo menos aproximadamente 80% ou pelo menos aproximadamente 85% ou pelo menos aproximadamente 90% ou pelo menos aproximadamente 95% ou pelo menos aproximadamente 98% de identidade de sequência com um polipeptídeo VpreB de sequência nativa. Em outra modalidade preferida, o "polipeptídeo VpreB variante" será menos que 95% ou menos que 90% ou menos que 85% ou menos que 80% ou menos que 75% ou menos que 70% ou menos que 65% ou menos que 60% idêntico em sua sequência de aminoácidos em relação a uma cadeia leve λ ou κ de anticorpo nativa. Os polipeptídeos VpreB variantes incluem especificamente, sem limitação, polipeptídeos VpreB em que a cauda única não similar a Ig no terminal C da sequência de VpreB é parcialmente ou completamente removida.

Os termos "polipeptídeo λ5 variante" e "uma variante de um polipeptídeo λ5" são utilizados de forma intercambiável e são definidos aqui como um polipeptídeo que difere de um polipeptídeo λ5 de sequência nativa em uma ou mais posições de aminoácidos como um resultado de uma modificação de aminoácido. O "polipeptídeo λ5 variante", como definido aqui, será diferente de uma cadeia leve λ ou κ de anticorpo nativa ou de um fragmento da mesma. O "polipeptídeo λ5 variante" irá preferencialmente manter pelo menos aproximadamente 65% ou pelo menos aproximadamente 70% ou pelo menos aproximadamente 75% ou pelo menos aproximadamente 80% ou pelo menos aproximadamente 85% ou pelo menos aproximadamen-

te 90% ou pelo menos aproximadamente 95% ou pelo menos aproximadamente 98% de identidade de sequência com um polipeptídeo λ5 de sequência nativa. Em outra modalidade preferida, o "polipeptídeo λ5 variante" será menos que 95% ou menos que 90% ou menos que 85% ou menos que 80% ou menos que 75% ou menos que 70% ou menos que 65% ou menos que 60% idêntico em sua sequência de aminoácidos em relação a uma cadeia leve λ ou κ de anticorpo nativa. Os polipeptídeos λ5 variantes incluem especificamente, sem limitação, polipeptídeos λ5 em que a cauda única no terminal N da sequência de λ5 é parcialmente ou completamente removida.

A porcentagem de identidade das sequências de aminoácidos pode ser determinada utilizando o programa de comparação de sequências NCBI-BLAST2 (Altschul e outros, Nucleic Acids Res. 25:3389-3402 (1997)). O programa de comparação de sequências NCBI-BLAST2 pode ser adquirido a partir do http://www.ncbi.nlm.nih.gov ou obtido de outra maneira no National Institute of Health, Bethesda, MD. O NCBI-BLAST2 utiliza vários parâmetros de busca, em que todos estes parâmetros de busca são ajustados em valores pré-estabelecidos incluindo, por exemplo, não mascarado = sim, fita = todo, ocorrências esperadas = 10, comprimento mínimo com complexidade baixa = 15/5, valor e multi-pass = 0,01, constante para multi-pass = 25, "dropoff" para o alinhamento com adição de espaços final = 25 e matriz de classificação = BLOSUM62.

O termo "sequência VpreB" é utilizado aqui para se referir à sequência de "VpreB", como definido anteriormente aqui ou a um fragmento da mesma.

O termo "sequência de λ5" é utilizado aqui para se referir à sequência de "λ5", como definido anteriormente aqui ou a um fragmento da mesma.

O termo "sequência de cadeia leve substituta", como definido aqui, significa qualquer sequência de polipeptídeo que compreende uma "sequência VpreB" e/ou uma "sequência de λ5", como definido anteriormente aqui. A "sequência de cadeia leve substituta", como definido aqui, inclui especificamente, sem limitação, a sequência de VpreB1 humana da SEQ ID

NO 1, as sequências de VpreB2 de camundongo das SEQ ID NOS: 2 e 3 e a sequência de VpreB3 humana da SEQ ID NO: 4 e suas várias isoformas, incluindo variações de processamento e variações formadas através de modificações pós-tradução, homólogos das mesmas em outras espécies de mamíferos, bem como fragmentos e variações das mesmas. O termo "sequência de cadeia leve substituta" inclui adicionalmente, sem limitação, a sequência de λ5 humana da SEQ ID NO: 5, a sequência similar a λ5 humana da SEQ ID NO: 6 e suas isoformas, incluindo variações de processamento e variações formadas através de modificações pós-tradução, homólogos das mesmas em outras espécies de mamíferos, bem como fragmentos e variações das mesmas. O termo "sequência de cadeia leve substituta" inclui adicionalmente uma sequência que compreende ambas as sequências de VpreB e λ5 como definido anteriormente aqui.

Para a estrutura tridimensional do receptor pré-célula B (pre-BCR), incluindo a estrutura da cadeia leve substituta (SCL) e seus componentes vide, por exemplo, Lanig e outros, *Mol. Immunol.* 40(17):1263-72 (2004).

A "sequência de cadeia leve substituta" pode ser opcionalmente conjugada a uma sequência de aminoácidos heterogênea ou qualquer outro componente heterogêneo, para formar uma "cadeia leve substituto constructo" descrita aqui. Assim, o termo "cadeia leve substituto constructo" é utilizado no sentido mais amplo e inclui quaisquer e todos os componentes heterogêneos adicionais, incluindo uma sequência de aminoácidos heterogênea, um ácido nucleico e outras moléculas conjugadas com uma sequência de cadeia leve substituta, em que "conjugação" é definida abaixo. Um "constructo de cadeia leve substituta" é também referida aqui como um "SURROBODY®" e os dois termos são utilizados de forma intercambiável.

No contexto dos polipeptídeos da presente invenção, o termo "sequência de aminoácidos heterogênea", relativo a uma primeira sequência de aminoácidos, é utilizado para se referir a uma sequência de aminoácidos que não está naturalmente associada com a primeira sequência de aminoácidos, pelo menos não na forma que está presente nos constructos de ca-

deia leve substituta apresentadas aqui. Assim, uma "sequência de aminoácidos heterogênea" relativa a uma VpreB é qualquer sequência de aminoácidos não associada com a VpreB nativa em seu ambiente nativo, incluindo, sem limitação, sequências de λ5 que são diferentes daquelas sequências de λ5 que, junto com a VpreB, formam a cadeia leve substituta em células B em desenvolvimento, tais como variações de sequências de aminoácidos, por exemplo, sequências de λ5 truncadas e/ou derivatizadas. Uma "sequência de aminoácidos heterogênea" relativa a uma VpreB inclui ainda sequências de λ5 associadas covalentemente a, por exemplo, fundidas a, VpreB, incluindo a sequência nativa λ5, uma vez que em seu ambiente nativo, as sequências de VpreB e λ5 não estão associadas de forma covalente, por exemplo, fundidas, uma com a outra. As sequências de aminoácidos heterogêneas incluem ainda, sem limitação, sequências de anticorpos, incluindo sequências de anticporos e de cadeia pesada e fragmentos das mesmas, tais como, por exemplo, sequências da região variável de cadeias leve e pesada do anticorpo e sequências da região constante de cadeias leve e pesada do anticorpo.

Os termos "conjugar", "conjugado(a)" e "conjugação" referem-se a quaisquer e todas as formas de ligação covalente ou não-covalente e incluem, sem limitação, a fusão genética ou química direta, o acoplamento através de um ligante ou de um agente de reticulação e a associação não-covalente, por exemplo, através de forças de Van der Waals ou através do uso de um zíper de leucina.

O termo "fusão" é utilizado aqui para se referir à combinação de sequências de aminoácidos de origem diferente em uma cadeia de polipeptídeo através da combinação em quadro de suas sequências de nucleotídeos codificadoras. O termo "fusão" abrange explicitamente fusões internas, isto é, inserção de sequências de origem diferente dentro de uma cadeia de polipeptídeo, em adição à fusão com um de seus terminais.

Como utilizado aqui, o termo "alvo" é uma substância que interage com um polipeptídeo apresentado aqui. Os alvos, como definido aqui, incluem especificamente antígenos com os quais os constructos contendo V-

preB da presente invenção interagem. Preferencialmente, a interação ocorre através de ligação direta.

Como utilizado aqui, todos os termos "peptídeo", "polipeptídeo" e "proteína" se referem a uma sequência de aminoácidos primária que são ligados através de "ligações peptídicas" covalentes. Em geral, um peptídeo consiste em alguns aminoácidos, tipicamente de aproximadamente 2 até aproximadamente 50 aminoácidos e é mais curto que uma proteína. O termo "polipeptídeo", como definido aqui, abrange peptídeos e proteínas.

O termo "aminoácido" ou "resíduo de aminoácido" refere-se tipicamente a um aminoácido que possui sua definição reconhecida na técnica tal como um aminoácido selecionado do grupo que consiste em: alanina (Ala); arginina (Arg); asparagina (Asn); ácido aspártico (Asp); cisteína (Cys); glutamina (Gln); ácido glutâmico (Glu); glicina (Gly); histidina (His); isoleucina (Ile): leucina (Leu); lisina (Lys); metionina (Met); fenilalanina (Phe); prolina (Pro); serina (Ser); treonina (Thr); triptofano (Trp); tirosina (Tyr); e valina (Val), embora aminoácidos modificados, sintéticos ou raros também possam ser utilizados quando desejado. Assim, os aminoácidos modificados e não usuais listados em 37 CFR 1.822(b)(4) estão especificamente incluídos dentro desta definição e são expressamente incorporados aqui como referência. Os aminoácidos podem ser subdivididos em vários subgrupos. Assim, os aminoácidos podem ser agrupados por possuírem uma cadeia lateral não polar (por exemplo, Ala, Cys, Ile, Leu, Met, Phe, Pro, Val); uma cadeia lateral carregada negativamente (por exemplo, Asp, Glu); uma cadeia lateral carregada positivamente (por exemplo, Arg, His, Lys); ou uma cadeia lateral polar não carregada (por exemplo, Asn, Cys, Gln, Gly, His, Met, Phe, Ser, Thr, Trp e Tyr). Os aminoácidos também podem ser agrupados como aminoácidos pequenos (Gly, Ala), aminoácidos nucleofílicos (Ser, His, Thr, Cys), aminoácidos hidrofóbicos (Val, Leu, Ile, Met, Pro), aminoácidos aromáticos (Phe, Tyr, Trp, Asp, Glu), amidas (Asp, Glu) e aminoácidos básicos (Lys, Arg).

O termo "polinucleotídeo(s)" refere-se a ácidos nucleicos tais como moléculas de DNA e moléculas de RNA e análogos das mesmas (por exemplo, DNA ou RNA gerado utilizando análogos de nucleotídeos ou utili-

zando química de ácidos nucleicos). Quando desejado, os polinucleotídeos podem ser produzidos de forma sintética, por exemplo, utilizando química de ácidos nucleicos reconhecida na técnica ou enzimaticamente utilizando, por exemplo, uma polimerase e, se desejado, podem ser modificados. As modificações típicas incluem metilação, biotinilação e outras modificações conhecidas na técnica. Em adição, a molécula de ácido nucleico pode ser de fita simples ou de fita duplo e, quando desejado, pode estar ligada a um grupamento que pode ser detectado.

O termo "variante" em relação a um polipeptídeo de referência refere-se a um polipeptídeo que possui pelo menos uma mutação ou uma modificação de aminoácido (isto é, alteração) quando comparado com um polipeptídeo nativo. As variações geradas pelas "modificações de aminoácidos" podem ser produzidas, por exemplo, através da substituição, da deleção, da inserção e/ou da modificação química de pelo menos um aminoácido na sequência nativa de aminoácidos.

Uma "modificação de aminoácido" refere-se a uma alteração na sequência de aminoácidos de uma sequência de aminoácidos predeterminada. Os exemplos de modificações incluem uma substituição, uma inserção e/ou uma deleção de aminoácido.

Uma "modificação de aminoácido em" uma posição especificada, refere-se à substituição ou à deleção do resíduo especificado ou à inserção de pelo menos um resíduo de aminoácido adjacente ao resíduo especificado. Por inserção "adjacente" a um resíduo especificado entende-se a inserção dentro de um até dois resíduos do mesmo. A inserção pode ser N-terminal ou C-terminal ao resíduo especificado.

Uma "substituição de aminoácido" refere-se à troca de pelo menos um resíduo de aminoácido existente em uma sequência de aminoácidos predeterminada por outro resíduo de aminoácido "de troca" diferente. O resíduo ou os resíduos de troca podem ser "resíduos de aminoácidos que ocorrem naturalmente" (isto é, codificados pelo código genético) e selecionados do grupo que consiste em: alanina (Ala); arginina (Arg); asparagina (Asn); ácido aspártico (Asp); cisteína (Cys); glutamina (Gln); ácido glutâmico

(Glu); glicina (Gly); histidina (His); isoleucina (Ile): leucina (Leu); lisina (Lys); metionina (Met); fenilalanina (Phe); prolina (Pro); serina (Ser); treonina (Thr); triptofano (Trp); tirosina (Tyr); e valina (Val). A substituição por um ou mais resíduos de aminoácidos que não ocorrem naturalmente é também abrangida pela definição de uma substituição de aminoácido apresentada aqui.

Um "resíduo de aminoácidos que não ocorre naturalmente" refere-se a um resíduo, sem ser os resíduos de aminoácidos que ocorrem naturalmente listados acima, que é capaz de se ligar de forma covalente a resíduo(s) de aminoácidos adjacente(s) em uma cadeia polipeptídica. Os exemplos de resíduos de aminoácidos que não ocorrem naturalmente incluem norleucina, ornitina, norvalina, homosserina e outros análogos de resíduos de aminoácidos tais como os descritos em Ellman e outros Meth. Enzym. 202:301 336 (1991). Para gerar tais resíduos de aminoácidos que não ocorrem naturalmente, podem ser utilizados os procedimentos de Noren e outros Science 244:182 (1989) e Ellman e outros, *supra*. Sucintamente, estes procedimentos envolvem a ativação química de um tRNA supressor com um resíduo de aminoácidos que não ocorre naturalmente seguida pela transcrição e pela tradução *in vitro* do RNA.

Uma "inserção de aminoácido" refere-se à incorporação de pelo menos um aminoácido em uma sequência de aminoácidos predeterminada. Embora a inserção consista geralmente da inserção de um ou dois resíduos de aminoácidos, o presente pedido de patente considera "inserções peptídicas" maiores, por exemplo, a inserção de aproximadamente três até aproximadamente cinco ou mesmo até aproximadamente dez resíduos de aminoácidos. O(s) resíduo(s) inserido(s) pode(m) ser o(s) que ocorre(m) naturalmente ou que não ocorre(m) naturalmente como descrito anteriormente.

Uma "deleção de aminoácido" refere-se à remoção de pelo menos um resíduo de aminoácido de uma sequência de aminoácidos predeterminada.

O termo "mutagênese" refere-se, a não ser que seja especificado de outra maneira, a qualquer técnica reconhecida na técnica para a alteração de um polinucleotídeo ou de uma sequência de polipeptídeo. Os tipos

preferidos de mutagênese incluem a mutagênese por PCR propensa a erros, a mutagênese por saturação ou outra mutagênese direcionada ao sítio.

"Mutagênese direcionada ao sítio" é uma técnica padronizada na técnica e é realizada utilizando um iniciador de oligonucleotídeo sintético complementar a um DNA de fago de fita simples que será submetido à mutagênese a não ser o pareamento errado limitado, representando a mutação desejada. Sucintamente, o oligonucleotídeo sintético é utilizado como um iniciador para direcionar a síntese de uma fita complementar ao DNA de fago de fita simples e o DNA de fita duplo resultante é transformado em uma bactéria hospedeira que carrega o fago. As culturas de bactérias transformadas são plaqueadas na superfície de ágar, permitindo a formação de placas partindo de células isoladas que carregam o fago. Teoricamente, 50% das novas placas conterão o fago que possui, na forma de uma fita simples, a forma mutada; 50% terão a sequência original. As placas de interesse são selecionadas através da hibridização com iniciador sintético tratado com quinase a uma temperatura que permite a hibridização de um pareamento exato, mas na qual os pareamentos errados com a fita original são suficientes para previnir a hibridização. As placas que se hibridizam com a sonda são então selecionadas, Sequênciadas e cultivadas e o DNA é recuperado.

No contexto da presente invenção, o termo "anticorpo" (Ab) é utilizado para se referir a um anticorpo nativo de uma cadeia pesada recombinada de forma clássica derivada da recombinação gênica de V(D)J e uma cadeia leve recombinada de forma clássica também derivada da recombinação gênica de VJ ou um fragmento das mesmas.

Um "anticorpo nativo" é uma glicoproteína heterotetramérica de aproximadamente 150.000 dáltons, composta de duas cadeias leves (L) idênticas e duas cadeias pesadas (H) idênticas. Cada cadeia leve é ligada a uma cadeia pesada através de ligação(ões) dissulfeto covalente(s), enquanto que o número de ligações dissulfeto varia entre as cadeias pesadas de isotipos de imunoglobulinas diferentes. Cada cadeia pesada e leve também possui pontes dissulfeto intracadeia espaçadas de forma regular. Cada cadeia pesada possui, em uma extremidade, um domínio variável (V_H) seguido

por um número de domínios constantes. Cada cadeia leve possui um domínio variável em uma extremidade (V_L) e um domínio constante em sua outra extremidade; o domínio constante da cadeia leve é alinhado com o primeiro domínio constante da cadeia pesada e o domínio variável da cadeia leve é alinhado com o domínio variável da cadeia pesada. Acredita-se que resíduos de aminoácidos particulares formam uma interface entre os domínios variáveis das cadeias leve e pesada, Chothia e outros, *J. Mol. Biol.* 186:651 (1985); Novotny e Haber, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 82:4592 (1985).

O termo "variável" com referência às cadeias de anticorpo é utilizado para se referir a ptécnicas das cadeias de anticorpo que diferem extensivamente em relação à sequência entre os anticorpos e participam da ligação e da especificidade de cada anticorpo particular por seu antígeno particular. Tal variabilidade fica concentrada em três segmentos chamados de regiões hipervariáveis nos domínios variáveis tanto da cadeia leve quando da cadeia pesada. As ptécnicas mais altamente conservadas dos domínios variáveis são chamadas de Região estrutural (FR). Os domínios variáveis das cadeias pesadas e leves nativas compreendem cada um quatro FRs (FR1, FR2, FR3 e FR4, respectivamente), adotando amplamente uma configuração em folha β, conectados através de três regiões hipervariáveis, que forma alças que se conectam e, em alguns casos, fazendo ptécnica da estrutura em folha β. As regiões hipervariáveis em cada cadeia são mantidas juntas em proximidade íntima pelas FRs e, com as regiões hipervariáveis da outra cadeia, contribuem para a formação do sítio de ligação ao antígeno de anticorpos (vide Kabat e outros, *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5ª Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991), páginas 647-669). Os domínios constantes não estão envolvidos diretamente na ligação de um anticorpo a um antígeno, mas exibem várias funções efetoras, tal como a participação do anticorpo na toxicidade celular dependente de anticorpo.

O termo "região hipervariável" quando utilizado aqui refere-se aos resíduos de aminoácidos de um anticorpo que são responsáveis pela ligação ao antígeno. A região hipervariável compreende resíduos de amino-

ácidos de uma "região de determinação da complementaridade" ou "CDR" (isto é, resíduos 30-36 (L1), 46-55 (L2) e 86-96 (L3) no domínio variável da cadeia leve e 30-35 (H1), 47-58 (H2) e 93-101 (H3) no domínio variável da cadeia pesada; MacCallum e outros, *J Mol Biol.* 262(5):732-45 (1996).

O termo "região estrutural" refere-se às ptécnicas reconhecidas na técnica de uma região variável do anticorpo que existe entre as regiões CDR mais divergentes. Tais regiões estruturais são tipicamente referidas como estruturas 1 até 4 (FR1, FR2, FR3 e FR4) e fornecem um suporte para manter, no espaço tridimensional, as três CDRs encontradas na região variável do anticorpo da cadeia pesada ou leve, de forma que as CDRs possam formar uma superfície de ligação ao antígeno.

Dependendo da sequência de aminoácidos do domínio constante de suas cadeias pesadas, os anticorpos podem ser ordenados em classes diferentes. Há cinco classes principais de anticorpos IgA, IgD, IgE, IgG e IgM e várias destas podem ser adicionalmente divididas em subclasses (isotipos), por exemplo, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA e IgA2.

Os domínios constantes da cadeia pesada que correspondem às classes diferentes de imunoglobulinas são chamados de α, δ, ε, γ e μ, respectivamente.

As "cadeias leves" dos anticorpos de qualquer espécie de vertebrado podem ser ordenadas em uma de dois tipos claramente definidos, chamados de kappa (κ) e lambda (λ), com base nas sequências de aminoácidos de seus domínios constantes. Qualquer referência a uma cadeia leve de anticorpo apresentada aqui inclui ambas as cadeias leves κ e λ.

"Fragmentos de anticorpo" compreendem uma ptécnica de um anticorpo de comprimento completo, geralmente a ligação ao antígeno ou um domínio variável do mesmo. Os exemplos de fragmentos de anticorpo incluem, mas não estão limitados aos fragmentos Fab, Fab', $F(ab')_2$, scFv e $(scFv)_2$.

Como utilizado aqui o termo "região de ligação ao anticorpo" refere-se a uma ou mais ptécnicas de uma imunoglobulina ou região variável do anticorpo capaz de se ligar a um ou mais antígenos. Tipicamente, a regi-

ão de ligação ao anticorpo é, por exemplo, uma cadeia leve de anticorpo (VL) (ou uma região variável da mesma), uma cadeia pesada de anticorpo (VH) (ou uma região variável da mesma), uma região Fd da cadeia pesada, uma cadeia leve e pesada do anticorpo combinada (ou uma região variável da mesma) tal como a Fab, $F(ab')_2$, anticorpo de domínio único ou de cadeia isolada (scFv) ou um anticorpo de comprimento completo, por exemplo, uma IgG (por exemplo, um subtipo IgG1, IgG2, IgG3 ou IgG4), anticorpo IgA1, IgA2, IgD, IgE ou IgM.

O termo "epitopo" como utilizado aqui, refere-se a uma sequência de pelo menos aproximadamente 3 até 5, preferencialmente pelo menos aproximadamente 5 até 10 ou pelo menos aproximadamente 5 até 15 aminoácidos e tipicamente não mais que aproximadamente 500 ou aproximadamente 1.000 aminoácidos, que definem uma sequência que por si só ou como ptécnica de uma sequência maior, se liga a um anticorpo gerado em resposta a tal sequência. Um epitopo não está limitado a um polipeptídeo que possui uma sequência idêntica à ptécnica da proteína original da qual é derivada. Na verdade, genomas virais estão em uma condição de modificação constante e exibem graus relativamente altos de variabilidade entre os isolados. Assim o termo "epitopo" abrange sequências idênticas à sequência nativa, assim como modificações, tais como deleções, substituições e/ou inserções na sequência nativa. Geralmente, tais modificações têm natureza conservativa, mas modificações não conservativas também são consideradas. O termo inclui especificamente "mimotopos", isto é, sequências que não identificam uma sequência nativa linear contínua ou não necessariamente ocorrem em uma proteína nativa, mas imitam funcionalmente um epitopo em uma proteína nativa. O termo "epitopo" inclui especificamente epitopos lineares e conformacionais.

O termo "vetor" é utilizado para se referir a uma molécula de rDNA capaz de sofrer replicação autônoma em uma célula e a qual um segmento de DNA, por exemplo, gene ou polinucleotídeo, pode ser ligado de forma opercional de forma a realizar a replicação do segmento ligado. Os vetores capazes de direcionar a expressão de genes que codificam um ou

mais polipeptídeos são referidos aqui como "vetores de expressão". O termo "sequências de controle" refere-se a sequências de DNA necessárias para a expressão de uma sequência codificadora ligada de forma operacional em um organismo hospedeiro particular. As sequências de controle que são adequadas para procariotos, por exemplo, incluem um promotor, opcionalmente uma sequência operadora e um sítio de ligação a ribossomos. É sabido que as células eucarióticas utilizam promotores, sinais de poliadenilação e intensificadores.

O ácido nucleico está "ligado de forma operacional" quando é colocado em uma relação funcional com outra sequência de ácido nucleico. Por exemplo, o DNA para uma pré-sequência ou um líder secretor está ligado de forma operacional ao DNA para um polipeptídeo se este for expresso na forma de uma pré-proteína que participa da secreção do polipeptídeo; um promotor ou um intensificador está ligado de forma operacional a uma sequência codificadora se este afetar a transcrição da sequência; ou um sítio de ligação a ribossomos está ligado de forma operacional a uma sequência codificadora se este estiver posicionado de forma que facilite a tradução. Geralmente, "ligado de forma operacional" significa que as sequências de DNA que estão ligadas são contíguas e, no caso de um líder secretor, contíguas e em fase para leitura. Entretanto, os intensificadores não precisam ser contíguos. A ligação é realizada através da ligação em sítios de restrição convenientes. Se tais sítios não existirem, os adaptadores de oligonucleotídeo sintético ou ligantes são utilizados de acordo com a prática convencional.

Uma "biblioteca de exibição em fagos" é uma biblioteca de expressão de proteínas que expressa uma coleção de sequências de proteínas clonadas na forma de fusões com uma proteína de revestimento de fago. Assim, a expressão "biblioteca de exibição em fagos" refere-se aqui a uma coleção de fago (por exemplo, fago filamentoso) em que o fago expressa uma proteína externa (tipicamente heteróloga). A proteína externa está livre para interagir com (se ligar a) outros grupamentos com os quais o fago é colocado em contato. Cada fago que exibe uma proteína externa é um "membro" da biblioteca de exibição em fagos.

O termo "fago filamentoso" refere-se a uma partícula viral capaz de exibir um polipeptídeo heterogêneo em sua superfície e inclui, sem limitação, f1, fd, Pf1 e M13. O fago filamentoso pode conter um marcador que pode ser selecionado tal como tetraciclina (por exemplo, "fd-tet"). Vários sistemas de exibição em fagos filamentosos são bem conhecidos pelos peritos na técnica (vide, por exemplo, Zacher e outros Gene 9: 127-140 (1980), Smith e outros Science 228: 1315-1317 (1985); e Parmley e Smith Gene 73: 305-318 (1988)).

O termo "panning" é utilizado para se referir aos vários ciclos de processo de seleção na identificação e no isolamento de fagos que carregam compostos, tais como anticorpos, com altas afinidade e especificidade a um alvo.

B. Descrição Detalhada

As técnicas para a realização dos métodos da presente invenção são bem conhecidas na técnica e são descritas em livros texto de laboratório padronizados, incluindo, por exemplo, Ausubel e outros, Current Protocols of Molecular Biology, John Wiley e Sons (1997); Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Terceira Edição, J. Sambrook e D. W. Russell, eds., Cold Spring Harbor, New York, USA, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001; O'Brian e outros, Analytical Chemistry of Bacillus Thuringiensis, Hickle e Fitch, eds., Am. Chem. Soc., 1990; Bacillus thuringiensis: biology, ecology and safety, T.R. Glare e M. O'Callaghan, eds., John Wiley, 2000; Antibody Phage Display, Methods and Protocols, Humana Press, 2001; e Antibodies, G. Subramanian, ed., Kluwer Academic, 2004. A mutagênese pode, por exemplo, ser realizada utilizando a mutagênese direcionada ao sítio (Kunkel e outros, Proc. Natl. Acad. Sci USA 82:488-492 (1985)). Os métodos de amplificação através da PCR são descritos nas Patentes U.S. Nºs 4.683.192, 4.683.202, 4.800.159 e 4.965.188 e em vários livros texto incluindo "PCR Technology: Principles and Applications for DNA Amplification", H. Erlich, ed., Stockton Press, New York (1989); e PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications, Innis e outros, eds., Academic Press, San Diego, Calif. (1990).

A presente invenção está relacionada o constructos e bibliotecas que compreendem sequências de cadeia leve substituta de anticorpos.

Constructos de cadeia leve substituta

Como discutido anteriormente, as pré-células B foram identificadas na medula óssea como linfócitos que produzem cadeias pesadas μ, mas, ao invés das cadeias leves completamente desenvolvidas, expressam um conjunto de genes específicos à linhagem B chamados de VpreB(1-3) e λ5, respectivamente. Os polipeptídeos de VpreB e λ5 formam juntos uma estrutura similar à cadeia leve de Ig associada de forma não-covalente, que é chamada de cadeia leve substituta. A cadeia leve substituta, embora não seja uma cadeia de anticorpo, se associa naturalmente com todas as cadeias pesadas de anticorpo e foi mostrado que os complexos de cadeia leve substituta-cadeia pesada de anticorpo se ligam a antígenos próprios.

Em um aspecto, a presente invenção fornece polipeptídeos que compreendem sequências de VpreB e/ou de λ5 e que possuem a capacidade de se ligar a um alvo. O alvo pode ser qualquer peptídeo ou polipeptídeo que é um parceiro de ligação para os polipeptídeos que contêm a sequência de VpreB e/ou de λ5 da presente invenção. Os alvos incluem especificamente todos os tipos de alvos geralmente referidos como "antígenos" no contexto da ligação ao anticorpo.

Assim, os polipeptídeos da presente invenção incluem, sem limitação, conjugados de sequências de VpreB com sequências de aminoácidos heterogêneas, contanto que mantenham a capacidade de se ligar a um alvo desejado. A ligação da sequência de VpreB com a sequência de aminoácidos heterogênea pode ser covalente ou não-covalente e pode ocorrer diretamente ou através de um ligante, incluindo ligantes peptídicos.

Os exemplos específicos dos constructos de polipeptídeos apresentadas aqui incluem polipeptídeos em que uma sequência de VpreB, tal como uma sequência de VpreB1, de VpreB2 ou de VpreB3, incluindo fragmentos e variações das sequências nativas, é conjugada a uma sequência de λ5, incluindo fragmentos e variações da sequência nativa. As fusões representativas deste tipo são ilustradas nas figuras 2 e 11 e descritas nos e-

xemplos.

Em uma fusão direta, tipicamente o terminal C de uma sequência de VpreB (por exemplo, uma sequência de VpreB1, de VpreB2 ou de V-preB3) é fundida como terminal N de uma sequência de λ5. Embora seja possível fundir o comprimento total de uma sequência nativa de VpreB a uma sequência de λ5 de comprimento completo (vide, por exemplo, o primeiro diagrama na figura 3), tipicamente a fusão ocorre no ou em torno do sítio análogo à CDR3 em cada um dos dois polipeptídeos. Tais sítios análogos à CDR3 para VpreB1 e λ5 são ilustrados na figura 1 e um constructo de fusão representativo é ilustrado na figura 2. Nesta modalidade, a fusão pode ocorrer dentro ou em uma localização dentro de aproximadamente 10 resíduos de aminoácidos em cada lado da região análoga à CDR3. Em uma modalidade preferida, a fusão ocorre aproximadamente entre os resíduos de aminoácidos 116-126 da sequência da VpreB1 humana nativa (SEQ ID NO: 1) e aproximadamente entre os resíduos de aminoácidos 82 e 93 da sequência da λ5 humana nativa (SEQ ID NO: 5).

É também possível fundir a sequência de VpreB com a região de CDR3 de uma cadeia leve λ do anticorpo, como mostrado na figura 2. Constructos adicionais, em que apenas uma de VpreB e λ5 está truncada são mostradas na figura 3. Constructos similares podem ser preparados utilizando do anticorpo κ cadeia leve sequências.

Estruturas de fusão direta adicionais são ilustradas do lado direito da figura 11. A estrutura denominada de "fusão de SLC 1" é um tetrâmero, composto de dois dímeros, em que a fusão de uma sequência V-preB1 truncada (que não possui a "cauda" característica no terminal C da VpreB1 nativa) com uma sequência de λ5 truncada similarmente está associada de forma não-covalente a uma cadeia pesada de anticorpo. A estrutura denominada de "fusão de SLC 2" é um tetrâmero, composto de dois dímeros, em que a fusão de uma sequência de VpreB1 truncada (que não possui a "cauda" característica no terminal C da VpreB1 nativa) com uma região constante de cadeia leve do anticorpo está associada de forma não-covalente a uma cadeia pesada de anticorpo. A estrutura denominada de "fusão de SLC 3" é um

tetrâmero, composto de dois dímeros, em que a fusão de uma cadeia leve de região variável do anticorpo com uma sequência de λ5 truncada (que não possui a "cauda" característica no terminal N da λ5 nativa) está associada de forma não-covalente a uma cadeia pesada de anticorpo.

Como citado anteriormente, em adição às fusões diretas, os constructos de polipeptídeos da presente invenção incluem associações não-covalentes de uma sequência de VpreB (incluindo fragmentos e variações de uma sequência nativa) a uma sequência heterogênea, tal como uma sequência de λ5 (incluindo fragmentos e variações da sequência nativa) e/ou uma sequência de anticorpo. Assim, por exemplo, uma sequência de VpreB de comprimento completo pode estar associada de forma não-covalente a uma sequência de λ5 truncada. Alternativamente, uma sequência de VpreB truncada pode estar associada de forma não-covalente a uma sequência de λ5 de comprimento completo.

Os constructos de cadeia leve substituta que compreendem sequências de VpreB1 e de λ5 associadas de forma não-covalente, em associação não-covalente com uma cadeia pesada de anticorpo, são mostradas do lado esquerdo da figura 11. Como as várias ilustrações mostram, as estruturas podem incluir, por exemplo, sequências de VpreB1 e de λ5 de comprimento completo, uma sequência de VpreB1 de comprimento completo associada a uma sequência de λ5 truncada ("Lambda 5dT"), uma sequência VreB1 truncada associada a uma sequência de λ5 de comprimento completo ("VpreB dT") e uma sequência de VpreB1 truncada associada a uma sequência de λ5 truncada ("Curta").

Embora a figura 11 ilustre certos constructos específicas, um versado comum na técnica considerará que uma variedade de outros constructos pode ser produzida e utilizada de uma maneira similar. Por exemplo, as estruturas podem ser assimétricas, compreendendo sequências de cadeia leve substituta diferentes em cada ramo e/ou possuindo estruturas triméricas ou pentaméricas, ao contrário das estruturas ilustradas na figura 11. É também possível incluir funcionalidades diferentes em várias ptécnicas dos constructos de cadeia leve substituta da presente invenção, produzindo

assim constructos multiespecíficos e/ou multivalentes.

Se desejado, os constructos da presente invenção podem ser engenheiradas, por exemplo, através da incorporação ou da ligação de sequências ou motivos de sequências conhecidos das regiões de CDR1, CDR2 e/ou CDR3 de anticorpos, incluindo anticorpos terapêuticos conhecidos nas regiões análogas à CDR1, CDR2 e/ou CDR3 das sequências de cadeia leve substituta. Isto permite a criação de moléculas que não são anticorpos, mas exibirão especificidades e afinidades de ligação muito similares àquelas de um anticorpo terapêutico conhecido.

Todos os constructos de cadeia leve substituta apresentada aqui podem estar associados a sequências de anticorpos. Por exemplo, como mostrado na figura 5, uma fusão de VpreB-λ5 pode estar ligada a uma sequência de região variável de cadeia pesada de anticorpo através de um ligante peptídico. Em uma outra modalidade, uma fusão de VpreB-λ5 está associada de forma não-covalente a uma cadeia pesada de anticorpo ou um fragmento da mesma incluindo uma sequência da região variável para formar um complexo dimérico. Ainda em uma outra modalidade, as sequências de VpreB e λ5 estão associadas de forma não-covalente a cada outra e uma cadeia pesada de anticorpo ou um fragmento da mesma incluindo uma sequência da região variável, formando assim um complexo trimérico. Os exemplos de constructos que compreendem uma cadeia pesada de anticorpo são ilustrados na figura 11.

Embora os constructos da presente invenção sejam ilustrados como referência a certas modalidades, um versado comum entenderá que várias modalidades adicionais obtidas através de várias permutações de cadeia leve substituta e sequências de anticorpos são possíveis e estão dentro do âmbito da presente invenção. A presente invenção inclui todas os constructos que compreendem sequências de cadeia leve substituta e que possuem a capacidade de se ligar a um alvo desejado. Em certa modalidade, os constructos também possuem a capacidade de se associar a sequências de região variável de cadeia pesada de anticorpo.

Os constructos da presente invenção podem ser utilizados para

construir bibliotecas de sequências de cadeia leve substituta, que podem ser utilizadas para várias finalidades, similarmente a bibliotecas de anticorpos, incluindo a seleção de constructos com as especificidades e as afinidades de ligação desejadas.

Quando as sequências de cadeia leve substituta de VpreB e λ5 estão associadas de forma não-covalente uma com as outras, as extremidades livres de um ou de ambos os componentes (isto é, a extremidade C-terminal da sequência de VpreB e/ou a extremidade N-terminal da sequência de λ5) estão disponíeis para a incorporação de uma diversidade adicional na biblioteca de tais sequências. Por exemplo, uma biblioteca de peptídeos aleatórios pode ser anexada ou substituída em uma destas extremidades livres e "peneiradas" em relação à ligação específica a um alvo particular. Através da combinação da cadeia leve substituta identificada como possuindo a especificidade de ligação desejada com uma cadeia pesada ou um fragmento de cadeia pesada de um anticorpo para o mesmo alvo, pode ser criada uma molécula que possui a capacidade de se ligar ao alvo cognato em dois locais distintos. Esta ligação em tandem ou efeito "quelante", reforça intensamente a ligação a um alvo isolado, similar aos efeitos de avidez observados em imunoglobulinas diméricas. É também possível utilizar componentes que se ligam a alvos diferentes. Assim, por exemplo, o componente de cadeia leve substituta com a especificidade de ligação desejada pode ser combinado com uma cadeia pesada de anticorpo ou um fragmento pesado que se liga a um alvo diferente. Por exemplo, o componente de cadeia leve substituta pode se ligar a um antígeno de tumor enquanto que a cadeia pesada de anticorpo ou o fragmento de cadeia pesada pode se ligar a células efetoras. Desta maneira, uma entidade única com direcionamento e atividade antitumor pode ser criada. Em uma modalidade particular, o apêndice ou o polipeptídeo que conecta as sequências de VpreB e λ5 pode ser um anticorpo ou fragmentos de anticorpo, tal como um Fab ou um fragmento de scFv. A incorporação de uma sequência de anticorpo não criará apenas um efeito "quelante", mas também pode gerar biespecificidade em uma única molécula, sem a necessidade de um segundo ramo independente, tal como o en-

contrado em anticorpos biespecíficos. As duas especificidades podem ser para ptécnicas diferentes do mesmo alvo, para alvos muito diferentes ou para um complexo de alvo anticorpo. Similarmente, constructos multiespecíficos podem ser produzidas com qualquer tipo de molécula, sem ser anticorpos ou fragmentos de anticorpos, incluindo peptídeos, proteínas, enzimas e similares. Por exemplo, o componente de cadeia leve substituta com a especificidade desejada pode ser combinado com qualquer peptídeo ou proteína terapêutica.

Preparação de constructos de cadeia leve substituta

Os constructos de cadeia leve substituta da presente invenção podem ser preparados através de métodos conhecidos na técnica, incluindo técnicas bem conhecidas da tecnologia de DNA recombinante.

O ácido nucleico que codifica cadeia leve substituta, por exemplo, polipeptídeos VpreB e λ5, pode ser isolado partindo de fontes naturais, por exemplo, células B em desenvolvimento e/ou obtido através de métodos sintéticos ou semissintéticos. Uma vez que o DNA foi identificado e isolado ou produzido de outra maneira, este pode ser ligado em um vetor que pode ser replicado para clonagem adicional ou para expressão.

Os vetores de clonagem e de expressão que podem ser utilizados para a expressão das sequências codificadoras dos polipeptídeos apresentados aqui são bem conhecidos na técnica e estão disponíveis comercialmente. Os componentes do vetor geralmente incluem, mas não estão limitados a um ou mais dos seguintes: uma sequência de sinal, uma origem de replicação, um ou mais genes marcadores, um elemento intensificador, um promotor e uma sequência de término da transcrição. As células hospedeiras adequadas para a clonagem ou para a expressão do DNA que codifica os constructos de cadeia leve substituta nos vetores apresentados aqui são células de procariotos, de levedura ou de eucariotos superiores (mamífero), as células de mamífero sendo preferidas.

Os exemplos de linhagens de células hospedeiras de mamíferos adequadas incluem, sem limitação, a linhagem renal CV1 de macaco transformada por SV40 (COS-7, ATCC CRL 1651); a linhagem renal embrionário

humano 293 (células 293) subclonadas para crescimento em cultura em suspensão, Graham e outros, J. Gen Virol. 36:59 (1977)); células renais 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 renais de macaco (CV1 ATCC CCL 70); células renais de macaco verde africano (VERO-76, ATCC CRL-1587); células de carcinoma cervical humano (HELA, ATCC CCL 2); células renais caninas (MDCK, ATCC CCL 34); células de fígado de "buffalo rat" (BRL 3A, ATCC CRL 1442); células pulmonares humanas (W138, ATCC CCL 75); células de fígado humano (Hep G2, HB 8065); tumor mamário de camundongo (MMT 060562, ATCC CCL51); células TRI (Mather e outros, Annals N.Y. Acad. Sci. 383:44-68 (1982)); células MRC 5; células FS4; e uma linhagem de hepatoma humano (Hep G2).

Para uso em células de mamífero, as funções de controle sobre os vetores de expressão são frequentemente fornecidas por material viral. Assim, promotores comumente utilizados podem ser derivados dos genomas de polioma, Adenovírus2, retrovírus, citomegalovírus e Vírus de Símio 40 (SV40). Outros promotores, tal como o promotor da β-actina, são originados de fontes heterólogas. Os exemplos de promotores adequados incluem, sem limitação, os promotores iniciais e tardios do vírus SV40 (Fiers e outros, Nature, 273: 113 (1978)), o promotor inicial imediato do citomegalovírus humano (Greenaway e outros, Gene, 18: 355-360 (1982)) e promotor e/ou sequências de controle normalmente associadas à sequência gênica desejada, contanto que tais sequências de controle sejam compatíveis com o sistema de célula hospedeira.

A transcrição de um DNA que codifica um polipeptídeo heterólogo desejado por eucariotos superiores é aumentada através da inserção de uma sequência intensificadora no vetor. O intensificador é um elemento do DNA que atua em cis, geralmenta de aproximadamente 10 até 300 pb, que atua sobre o promotor para aumentar sua atividade de início da transcrição. Os intensificadores são relativamente independentes da orientação e da po-

sição, mas preferencialmente ficam localizados a montante da sequência promotora presente no vetor de expressão. O intensificador poderia ser originado da mesma fonte que o promotor, tal como, por exemplo, de um vírus de célula eucariótica, por exemplo, o intensificador do SV40 do lado tardio da origem de replicação (pb 100-270), o intensificador do promotor inical de citomegalovírus, o intensificador de polioma do lado tardio da origem de replicação e intensificadores de adenovírus.

Os vetores de expressão utilizados em células hospedeiras de mamíferos também contêm sítios de poliadenilação, tais como os derivados de vírus tal como, por exemplo, o SV40 (inicial e tardio) ou o HBV.

Uma origem de replicação pode ser fornecida através do constructo do vetor para incluir uma origem exógena, de forma que pode ser derivada do SV40 ou outra fonte viral (por exemplo, Polioma, Adeno, VSV, BPV) ou pode ser fornecida pela célula hospedeira.

Os vetores de expressão contêm geralmente um marcador que pode ser selecionado que codifica uma proteína necessária para a sobrevivência ou para o crescimento de uma célula hospedeira transformada com o vetor. Os exemplos de marcadores que podem ser selecionados adequados para células de mamífero incluem dihidrofolato redutase (DHFR), timidina quinase (TK) e neomicina.

Os vetores de expressão de mamíferos adequados são bem conhecidos na técnica e estão disponíveis comercialmente. Assim, por exemplo, os constructos de cadeia leve substituta da presente invenção podem ser produzidos em células hospedeiras de mamíferos utilizando um vetor de expressão pCI (Promega), que carrega a região intensificadora/promotora imediata inicial do citomegalovírus (CMV) humano para promover a expressão constitutiva de um inserto de DNA. O vetor pode conter um gene da neomicina fosfotransferase como um marcador que pode ser selecionado.

Os constructos de cadeia leve substituta da presente invenção também podem ser produzidos em células hospedeiras bacterianas. Os elementos de controle para uso em sistemas bacterianos incluem promotores, contendo opcionalmente sequências operadoras e sítios de ligação a ribos-

somos. Os promotores adequados incluem, sem limitação, os promotores de galactose (gal), lactose (lac), maltose, triptofano (trp), β-lactamase, promotores de bacteriófagos λ e T7. Em adição, podem ser utilizados promotores sintéticos, tal como o promotor Tac. Os promotores para uso em sistemas bacterianos também contêm geralmente uma sequência de Shine-Dalgarno (SD) ligada de forma operacional ao DNA que codifica a molécula de Fab. A origem de replicação do plasmídeo pBR322 é adequada para a maioria das bactérias Gram-negativas.

As sequências codificadoras das cadeias individuais dentro de um constructo multicadeias que compreende sequências de anticorpos de cadeia leve substitutas podem estar presentes no mesmo vetor de expressão, sob o controle de sequências reguladoras separadas ou em vetores de expressão separados, utilizados para co-transfectar células hospedeiras desejadas, incluindo hospedeiros eucarióticos e procarióticos. Assim, vários genes podem ser coexpressos utilizando os vetores Duet® disponíveis comercialmente na Novagen.

As células hospedeiras transformadas podem ser cultivadas em uma variedade de meios. Os meios disponíveis comercialmente para a cultura de células hospedeiras de mamíferos incluem Ham's F10 (Sigma), Meio Essencial Mínimo (Minimal Essential Medium ((MEM)), (Sigma), RPMI-1640 (Sigma) e Meio de Eagle Modificado por Dulbecco ((DMEM), Sigma). Em adição, qualquer um dos meios descritos em Ham e outros, Meth. Enz. 58:44 (1979) e Barnes e outros, Anal. Biochem. 102:255 (1980) pode ser utilizado como meio de cultura para as células hospedeiras. As condições de cultura, tais como temperatura, pH e similares, são as utilizadas anteriormente com a célula hospedeira selecionada para expressão e são incluídas nas instruções do fabricante ou serão de outra maneira evidentes para o versado comum na técnica.

Ainda, os meios adequados para a cultura de células hospedeiras de mamíferos, bacterianas (por exemplo, *E. coli*) ou outras também são descritos em livros textos padronizados, tal como, por exemplo, Sambrook e outros, *supra* ou Ausubel e outros, *supra*.

A purificação pode ser realizada através de métodos conhecidos na técnica. Em uma modalidade preferida, as moléculas de anticorpo substitutas são purificadas em uma forma marcada com 6xHis, utilizando o sistema de purificação Ni-NTA (Invitrogen).

As bibliotecas compreendem sequências de cadeia leve substituta

A presente invenção está adicionalmente relacionada a várias bibliotecas de sequências de cadeia leve substituta e constructos que compreendem tais sequências. Assim, tais bibliotecas podem compreender, consistir essencialmente de ou consistir de display de sequências de cadeia leve substituta, tais como os constructos que contêm VpreB e/ou λ5 da presente invenção, incluindo, sem limitação, aquelas descritas especificamente acima, ilustradas nas figuras e/ou descritas nos Exemplos.

As bibliotecas da presente invenção estão preferencialmente na forma de um display. Os sistemas para exibição de proteínas heterólogas, incluindo anticorpos e outros polipeptídeos, são bem conhecidos na técnica. Foram exibidos na superfície de fago filamentoso os fragmentos de anticorpos que codificam os genes de anticorpos (Hoogenboom e Winter *J. Mol. Biol.*, 222:381 388 (1992); McCafferty e outros, *Nature* 348(6301):552 554 (1990); Griffiths e outros *EMBO J.*, 13(14):3245-3260 (1994)). Para uma revisão das técnicas para a seleção e para a verificação de bibliotecas de anticorpos vide, por exemplo, Hoogenboom, *Nature Biotechnol.* 23(9):1105-1116 (2005). Em adição, há sistemas conhecidos na técnica para a exibição de proteínas heterólogas e fragmentos das mesmas na superfície de *Escherichia coli* (Agterberg e outros, *Gene* 88:37-45 (1990); Charbit e outros, *Gene* 70:181-189 (1988); Francisco e outros, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:2713-2717 (1992)) e levedura, tal como *Saccharomyces cerevisiae* (Boder e Wittrup, *Nat. Biotechnol.* 15:553-557 (1997); Kieke e outros, *Protein Eng.* 10:1303-1310 (1997)). Outras técnicas de exibição conhecidas incluem exibição de ribossomos ou de mRNA (Mattheakis e outros, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91:9022-9026 (1994); Hanes e Pluckthun, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94:4937-4942 (1997)), exibição de DNA (Yonezawa e outros, *Nucl. Acid*

Res. 31(19):e118 (2003)); exibição em células microbianas, tal como exibição bacteriana (Georgiou e outros, *Nature Biotech.* 15:29-34 (1997)), exibição em células de mamífero, exibição em esporos (Isticato e outros, *J. Bacteriol.* 183:6294-6301 (2001); Cheng e outros, *Appl. Environ. Microbiol.* 71:3337-3341 (2005) e pedido de patente provisório copendente Nº de Série 60/865.574, depositado em 13 de novembro de 2006), exibição viral, tal como exibição em retrovírus (Urban e outros, *Nucleic Acids Res.* 33:e35 (2005), exibição baseada na ligação de proteína-DNA (Odegrip e outros, *Proc. Acad. Natl. Sci. USA* 101:2806-2810 (2004); Reiersen e outros, *Nucleic Acids Res.* 33:e10 (2005)) e exibição em microesferas (Sepp e outros, *FEBS Lett.* 532:455-458 (2002)).

Para a finalidade da presente invenção, as bibliotecas que contêm cadeias leves substitutas podem ser vantajosamente exibidas utilizando qualquer técnica de exibição, incluindo exibição em fagos e exibição em esporos.

Na exibição em fagos, a proteína heteróloga, tal como um polipeptídeo de cadeia leve substituta, é ligada a uma proteína do revestimento de uma partícula de fago, enquanto a sequência de DNA da qual esta foi expressa é empacotada dentro do revestimento do fago. Detalhes dos métodos de exibição em fagos podem ser encontrados, por exemplo, em McCafferty e outros, *Nature* 348, 552-553 (1990)), que descrevem a produção de anticorpos e fragmentos de anticorpos humanos *in vitro*, partindo de repertórios de genes do domínio variável (V) de imunoglobulinas de doadores não-imunizados. De acordo com esta técnica, os genes do domínio V do anticorpo são clonados em quadro dentro do gene de proteína de revestimento maior ou menor de um bacteriófago filamentoso, tal como M13 ou fd e exibidos na forma de fragmentos de anticorpo funcionais na superfície da partícula de fago. Devido ao fato de que a partícula filamentosa contém uma cópia de DNA de fita simples do genoma do fago, seleções baseadas nas propriedades funcionais do anticorpo também resultam na seleção do gene que codifica o anticorpo que exibe tais propriedades. Assim, o fago imita algumas das propriedades da célula B.

A exibição em fagos pode ser realizada em uma variedade de formatos; para a revisão dos mesmos vide, por exemplo, Johnson, Kevin S. e Chiswell, David J., *Current Opinion in Structural Biology* 3, 564-571 (1993). Várias fontes de segmentos de gene V de cadeia pesada podem ser descobertas através da exibição em fagos. Clarkson e outros, *Nature* 352, 624-628 (1991) isolaram um arranjo diverso de cadeias pesadas e cadeias leves antioxazolona partindo de uma biblioteca combinatória aleatória pequena de genes V derivados dos baços de camundongos imunizados. Um repertório de genes V de cadeias pesada e leve provenientes de doadores humanos não imunizados pode ser construído e recuperado de forma específica a um arranjo diverso de antígenos (incluindo antígenos próprios) seguindo essencialmente as técnicas descritas por Marks e outros, *J. Mol. Biol.* 222, 581-597 (1991) ou Griffith e outros, *EMBO J.* 12, 725-734 (1993). Estas e outras técnicas conhecidas na técnica, podem ser adaptadas para a exibição de qualquer polipeptídeo, incluindo polipeptídeos e outros constructos que compreendem sequências de cadeia leve substituta. Assim, por exemplo, a cadeia leve substituta pode ser suplementada com uma coleção de cadeias pesadas provenientes de uma fonte naturalmente diversa, tal como linfócitos ou uma coleção gerada de forma sintética criada inteiramente através de técnicas de biologia molecular. Estas coleções podem ser clonadas, expressas e selecionadas através de métodos conhecidos na técnica. O SURROBODY® resultante selecionado pode ser utilizado diretamente, expresso na forma de uma molécula multimérica ou pode ser adicionalmente otimizado através da otimização da cadeia pesada ou da otimização da cadeia leve substituta, por exemplo, utilizando mutagênese aleatória ou específica ao sítio não-aleatória ou regional.

Os sistemas de exibição em esporos se baseiam na ligação das sequências que serão exibidas com uma proteína de revestimento, tal como uma proteína de revestimento de esporos de *Bacillus subtilis*. O protoplasto do esporo (núcleo) é circundado pela parede celular, o córtex e o revestimento do esporo. Dependendo da espécie, também pode estar presente um exósporo. A parede do núcleo é composta do mesmo tipo de peptidoglicana

que a parede celular vegetativa. A exibição em esporos, incluindo um sistema de exibição na superfície utilizando um componente do revestimento do esporo de *Bacillus subtilis* (CorB) e exibição em esporos de *Bacillus thuringiensis (Bt)*, são descritos em Isticato e outros, *J. Bacteriol.* 183:6294-6301 (2001); Cheng e outros, *Appl. Environ. Microbiol.* 71:3337-3341 (2005), cujas descrições inteiras são expressamente incorporadas aqui como referência. Várias técnicas de exibição em esporos também são descritas nas Publicações de Pedidos de Patentes U.S. Nos 20020150594; 20030165538; 20040180348; 20040171065; e 20040254364, as divulgações inteiras são expressamente incorporadas aqui como referência.

Uma vantagem dos sistemas de exibição em esporos é a superfície de partícula e o tamanho de partícula homogêneos de natureza não-eucariótica, que é esperado que fornecem uma base não reativa. Em adição, o tamanho de partícula dos esporos é suficiente para possibilitar a seleção por citometria de fluxo que permite o isolamento clonal que pode ser selecionado, com base nas interações.

Aumentando a estabilidade de esporos, é possível realizar vários tratamentos e modificações químicas, enzimáticas e/ou ambientais pós-esporulação. Assim, é possível estabilizar estruturas helicoidais estruturais com tratamento químico utilizando trifluoroetanol (TFE), quando tais estruturas são exibidas. Em adição, são possíveis tratamentos com estresse oxidativo, tais como tratamentos com Espécies de Oxigênio Reativas (por exemplo, peróxido) ou Espécies de Nitrogênio Reativas (por exemplo, ácido nitroso). É também possível expor populações definidas ou em estado natural de polipeptídeos exibidos em esporos a tratamentos enzimáticos, tal como exposição proteolítica, outros processos enzimáticos, fosforilação etc. Outros tratamentos possíveis incluem, sem limitação, nitrosilação através de tratamento com peroxinitrita, proteólise através de tratamento com protease recombinante, purificada ou do soro, irradiação, coincubação com chaperonas conhecidas, tais como proteínas de choque térmico (tanto bacterianas quanto de mamíferos), tratamento com proteínas de dobramento, tais como proteína dissulfeto isomerase, prolil isomerase etc., liofilização e tratamentos simi-

lares à preservação, tal como tratamento com timerosol. Estes tratamentos podem ser realizados através de métodos bem conhecidos na técnica.

Técnicas similares podem ser utilizadas em todos os sistemas de exibição em esporos, incluindo exibições em que a ligação é feita a uma proteína de revestimento de esporo, incluindo, por exemplo, os sistemas de exibição em esporos divulgados em

Usos de sequências de cadeia leve substituta, constructos e bibliotecas contendo as mesmas

As bibliotecas da presente invenção podem ser utilizados para identificar sequências de cadeia leve substituta e constructos de cadeia leve substituta, tais como fusões que compreendem sequências de cadeia leve substituta, com propriedades desejadas. Por exemplo, a verificação *in vitro* ou *in vivo* das bibliotecas apresentadas aqui pode fornecer polipeptídeos que compreendem sequências de cadeia leve substituta que se ligam a alvos desejados com altas especificidade e afinidade de ligação. Assim, as bibliotecas apresentadas aqui podem ser utilizadas para identificar moléculas com finalidades terapêuticas e de diagnóstico, tais como polipeptídeos que compreendem sequências de cadeia leve substituta que se ligam a marcadores de tumores ou outros alvos moleculares de intervenção terapêutica. Em adição, através das técnicas descritas anteriormente, bibliotecas altamente diversas de polipeptídeos de cadeias leves substitutas podem ser engenheiradas, incluindo bibliotecas que compreendem uma coleção de polipeptídeos que se ligam ao mesmo alvo, bibliotecas de polipeptídeos que se ligam a alvos diferentes, bibliotecas de polipeptídeos com várias especificidades e similares.

Como um resultado de sua capacidade de se ligarem a qualquer alvo desejado, os constructos de cadeia leve substituta de anticorpo da presente invenção podem ser utilizadas em ensaios analíticos e diagnósticos, para detectar a presença de uma molécula alvo desejada, tal como um antígeno de tumor ou qualquer polipeptídeo associado a um estado de doença ou estado de saúde. Em adição, as constructos de cadeia leve substituta da presente invenção podem ser utilizados como agentes terapêuticos, tal co-

mo, por exemplo, na terapia para câncer, para direcionamento a antígenos de tumor que foram determinados como estando associados com o desenvolvimento e/ou o espalhamento de câncer.

Detalhes adicionais da invenção são fornecidos nos Exemplos não limitantes a seguir.

Exemplo 1

VpreB como uma proteína de domínio de ligação e fusões que contém a mesma

Para produzir um domínio de ligação de VpreB, uma proteína isolada mostrada na figura 5 é criada de forma recombinante. O constructo de proteína do domínio de ligação a SLC é compreendido dos aminoácidos 20 até 121 de VpreB1 e dos aminoácidos 87 até 105 de λ5. Se desejado, para criar capacidades novas e de ligação específica, a molécula é reengenheirada de acordo com evidências estruturais ou da sequência. Adicionalmente ou alternativamente, uma coleção de variações é criada aleatoriamente, por exemplo, através de PCR propensa a erros ou diretamente através de mutagênese específica a um único ou a vários sítios com uma coleção de aminoácidos. Os clones ou as coleções resulantes são então clonadas em quadro com pIII para uso na exibição em fagos ou fagemídeos. Este constructo de fagemídeo é transformado em células TG1. A seguir, uma colônia isolada é propagada em Luria Broth (LB) suplementado com 50 μg/mL de Ampicilina e 2% de glicose até atingir DO600 de ~0,3 e infectada com o fago auxiliador MK307 a 37 °C durante 30 minutos sem agitação. As células são então peletizadas e então ressuspensas em LB contendo 50 μg/mL de ampicilina e 75 μg/mL de canamicina e foi permitido que crescessem durante a noite com aeração vigorosa a 30 °C. No dia seguinte o sobrenadante contendo a proteína de fusão SLC-HC expressa em fagemídeo é utilizado em Fogo-ELISAs para determinar a ligação ao alvo. Sucintamente, o ELISA envolve o revestimento e o bloqueio de uma placa de ELISA com TNF-α humano, seguidos pela incubação do fago com SLC-HC durante 2 horas a 4 °C, lavagem com PBS-Tween-20 (0,05%) e detecção direta com o anticorpo anti-m13-HRP. Alternativamente, a ligação é avaliada através da amplificação direta ou da

eluição do fago ligado e os títulos dos fagos são determinados utilizando células XL-1Blue. Este exemplo descreve uma fusão do domínio de ligação de SLC na forma de um clone isolado, mas esta SLC pode ser recombinada de forma recombinante com outras sequências heterólogas que reconhecem um alvo comum e verificada na forma de uma biblioteca. Além disso, esta proteína de ligação à SLC pode ser combinada com uma coleção previamente selecionada de cadeias pesadas e verificada diretamente no mesmo alvo de interesse ou um segundo alvo de interesse para criar uma molécula biespecífica. Alternativamente, isto reforçou que a ligação ou a ligação biespecífica pode ser descoberta através da verificação em associação com coleções não selecionadas de cadeias pesadas. Em adição, embora este exemplo se refira às cadeias pesadas de anticorpo, deve ser entendido que uma cadeia pesada completa não é necessária. Fusões de cadeia isolada que compreendem sequências da região variável da cadeia pesada, na ausência de uma região constante de cadeia pesada ou uma região constante de cadeia pesada completa, podem ser produzidas de uma maneira análoga e estão dentro do âmbito deste exemplo.

Exemplo 2

Fusões de VpreB como um parceiro de cadeia pesada variável (VH)

Uma proteína de fusão VpreB-λ5 funcional mostrada no segundo diagrama da figura 5 (denominada de "Proteína de fusão de VpreB – complexo dimérico") é criada de forma recombinante. A proteína de fusão VpreB-λ5 é compreendida de uma sequência de sinal do gene III de m13, os aminoácidos 20 até 115 de VpreB1 e os aminoácidos 83 até 209 de λ5. Este constructo é coexpressa com uma fusão de cadeia pesada variável-CH1 em quadro com pIII para uso na exibição em fagos ou em fagemídeos. Como uma sequência codificadora de VH, a sequência codificadora de VH do anticorpo anti-TNFα, D2E7, é utilizado e CH1 é a região CH1 da IgG1 humana. Este constructo de fagemídeo é transformadas em células TG1. A seguir, uma colônia isolada é propagada em Luria Broth (LB) suplementado com 50

μg/mL de ampicilina e 2% de glicose até atingir DO600 de ~0,3 e infectada com o fago auxiliador MK307 a 37 graus durante 30 minutos, sem agitação. As células são então peletizadas e então ressuspensas em LB contendo 50 μg/mL de ampicilina e 75 μg/mL de canamicina é é permitido que cresçam durante a noite com aeração vigorosa a 30 graus. No dia seguinte, o sobrenadante contendo a proteína de fusão SLC-HC expressa em fagemídeo é utilizado em Fogo-ELISAs para determinar a ligação ao alvo. Sucintamente o ELISA envolve o revestimento e o bloqueio de uma placa de ELISA com TNF-α humano, seguidos pela incubação do fago com SLC-HC durante 2 horas a 4 graus, lavagem com PBS-Tween-20 (0,05%) e detecção direta com o anticorpo anti-m13-HRP. Alternativamente a ligação pode ser avaliada através da amplificação direta ou da eluição do fago ligado e os títulos dos fagos são determinados utilizando células XL-1Blue. Este exemplo descreve uma fusão de SLC utilizada como parceiro de ligação com uma fusão de cadeia pesada variável-CH1 na forma de um clone isolado, mas esta SLC também pode ser combinada com uma coleção concentrada de regiões variáveis de cadeia pesada que reconhecem um alvo comum e verificada na forma de uma biblioteca. Além disso, esta fusão de SLC pode ser combinada com uma coleção não-selecionada de cadeias pesadas e verificada diretamente em um alvo de interesse. Como uma fusão de SLC razoável alternativa, a associação de VH pode ser reforçada através da fusão da região lambda constante de uma cadeia leve de anticorpo tradicional ao invés do fragmento da proteína λ5.

Exemplo 3

VpreB e lambda5 na forma de um parceiro de cadeia pesada variável (VH) associado

A proteína coexpressa VpreB-λ5 mostrada no terceiro diagrama da figura 5 (denominada de "VpreB e lambda 5 – complexo trimérico") é constituída de uma sequência de sinal do gene III de m13 e os aminoácidos correspondentes da VpreB1 processada madura prevista (aminoácidos 20 até 146) e lambda 5 (aminoácidos 31 até 209). Estas são coexpressas com uma fusão de cadeia pesada variável-CH1 em quadro com pIII para uso na

exibição em fagos ou em fagemídeos. Como uma sequência codificadora de VH, a sequência codificadora de VH do anticorpo anti-TNFα, D2E7, é utilizada e CH1 é a região CH1 da IgG1 humana. Este constructo de fagemídeo é transformada em células TG1. A seguir, uma colônia isolada é propagada em Luria Broth (LB) suplementado com 50 μg/mL de ampicilina e 2% de glicose até atingir DO600 de ~0,3 e é então infectada com o fago auxiliador MK307 a 37 graus durante 30 minutos, sem agitação. As células são então peletizadas e então ressuspensas em LB contendo 50 μg/mL de ampicilina e 75 μ/mL de canamicina é é permitido que cresçam durante a noite com aeração vigorosa a 30 graus. No dia seguinte o sobrenadante contendo os complexos proteicos triméricos de SLC HC expressos em fagemídeos é utilizado em Fogo-ELISAs para determinar a ligação ao alvo. Sucintamente o ELISA envolve o revestimento e o bloqueio de uma placa de ELISA com TNF-α humano, seguidos pela incubação do fago com SLC-HC durante 2 horas a 4 graus, lavagem com PBS-Tween-20 (0,05%) e detecção direta com o anticorpo anti-m13-HRP. Alternativamente a ligação pode ser avaliada através da amplificação direta ou da eluição do fago ligado e os títulos dos fagos são determinados utilizando células XL-1Blue. Este exemplo descreve a SLC utilizada como parceiro de ligação com uma fusão de cadeia pesada variável-CH1 na forma de um clone isolado, mas esta SLC pode ser combinada com uma coleção concentrada de regiões variáveis de cadeia pesada que reconhecem um alvo comum e verificada na forma de uma biblioteca. Além disso, esta fusão de SLC pode ser combinada com uma coleção não-selecionada de cadeias pesadas e verificada diretamente em um alvo de interesse.

Exemplo 4

Engenharia de diversidade nas regiões análogas à CDR3 de V-preB1

Uma vez que as regiões análogas à CDR da cadeia leve substituta (SLC) terão funções similares às das CDRs de uma cadeia leve de anticorpo, é importante determinar os pontos de fusão entre a VpreB e a λ5. De acordo com uma abordagem, o ponto de fusão mais adequado para uma fi-

nalidade particular é determinado partindo do sítio análogo à CDR3 que contém todos os aminoácidos de VpreB e substituindo de forma crescente os aminoácidos de posição em posição da λ5 codificada em oligonucleotídeos que podem ser clonados. Esta substituição crescente continua até que o sítio análogo à CDR esteja totalmente composto de uma sequência de origem de λ5. Em algum ponto durante este processo, poderia ser desejável adicionar uma cadeia pesada complementar e permitir/facilitar sua ligação e seu reconhecimento de antígenos. Para aumentar adicionalmente ou possibilitar esta complementação, a diversidade aleatória pode ser utilizada em qualquer um dos sítios análogos à CDR, assim como a diversidade baseada na análise do comprimento de CDRs combinadas. Alternativamente ou em adição, as sequências Vλ5 do anticorpo podem ser utilizadas para adicionar diversidade, uma vez que seus comprimentos de CDRs se combinam bem com os comprimentos de sítios análogos à CDR de VpreB.

Exemplo 5

Adição de funcionalidades aos componentes de SLC

Uma vez que a SLC é compreendida de dois polipeptídeos independentes isto cria oportunidades naturais para anexar ou embutir funcionalidades secundárias. No presente Exemplo, no primeiro caso um scFv anti-VEGF é inserido para criar uma proteína de fusão que liga VpreB e λ5 (figura 9A). Este scFv que restringe a SLC engenheirado resultante é pareado com a cadeia pesada de um anticorpo anti-TNF-α. O constructo resultante é co-expressa com a cadeia pesada clonada em quadro com pIII para uso na exibição em fagos ou em fagemídeos. Este constructo de fagemídeo é transformada em células TG1 e uma colônia isolada é propagada em Luria Broth (LB) suplementado com 50 μg/mL de ampicilina e 2% de glicose até atingir DO600 de ~0,3 e infectada com o fago auxiliador MK307 a 37 °C durante 30 minutos sem agitação. As células são então peletizadas e então ressuspensas em LB contendo 50 μg/mL de ampicilina e 75 μg/mL de canamicina é é permitido que cresçam durante a noite com aeração vigorosa a 30 °C. No dia seguinte o sobrenadante contendo proteína de fusão SLC-HC expressa em fagemídeo é utilizado em Fogo-ELISAs para determinar a ligação ao alvo.

Sucintamente o ELISA envolve o revestimento e o bloqueio de uma placa de ELISA com TNF-α humano ou VEGF humano, seguidos pela incubação do fago com SLC-HC durante 2 horas a 4 °C, lavagem com PBS-Tween-20 (0,05%) e detecção direta com o anticorpo anti-m13-HRP.

A seguir, é criada uma fusão do scFv anti-VEGF como terminal C de VpreB e o constructo de complexo proteico tripartido resultante é avaliada similarmente ao ELISA com fagemídeos descrito anteriormente.

Alternativamente, o scFv antiovalbumina é fundido ao terminal amino de λ5 e o complexo proteico tripartido é testado em relação à ligação tanto ao TNF-α quanto à ovalbumina.

Finalmente, estes dois constructos de fusão (a VpreB-scFv anti-VEGF e a λ5-anti-ovalbumina) são combinadas com a cadeia pesada do anticorpo anti-TNF-α para criar uma molécula triespecífica, que é então confirmada no ELISA com fagemídeo como descrito anteriormente.

Na descrição, o scFv contra alvos distintos é incorporado, porém podem ser combinados ligantes funcionais ao mesmo alvo para criar "superligantes" em tandem. Estes ligantes em tandem pode fornecer ligação reforçada ou até mesmo, em alguns casos, a função de ligação cruzada. A ligação cruzada de Fab será benéfica em casos em que anticorpos inteiros fornecem ligação cruzada indesejável e prolongada. Por exemplo, pode não ser desejável que anticorpos do receptor de insulina de imunoglobulina inteira que atuam como substitutos de insulina requeram 3-4 semanas para a eliminação do soro. Uma vez que a insulina possui geralmente uma meia-vida de minutos, um Fab estaria mais de acordo com esta escala de meia-vida e então a funcionalidade em tandem poderia ser dirigida apropriadamente por este pedido de patente.

As descrições anteriores descrevem apenas anticorpos como grupos funcionais secundários, mas também podem incorporar similarmente peptídeos relevantes (por exemplo, imitadores de eritropoietina (EPO)), receptores (por exemplo, TNF-RI), proteínas de ligação (por exemplo, IL-1ra) e qualquer proteína terapêutica, tal como interferons, às constructos anexadas e limitadas para criar moléculas de funções similares.

Ainda poderiam ser utilizados os dois sítios para incorporar proteínas heterodiméricas, de forma que as cadeias pesada e leve criem uma molécula similar a Fab secundária.

Finalmente, foram descritos somente casos singulares, mas a incorporação de bibliotecas de anticorpos em fagos distintas de forma combinatória e bibliotecas de diversidade de peptídeos também é incluída aqui, para verificar anticorpos candidatos de SLC contra seus alvos direcionados e desejados.

Exemplo 6

Expressão de constructos de cadeia leve substituta (SURROBODY®) em células de mamífero

As sequências codificadoras dos componentes de cadeia leve substituta das estruturas mostradas na figura 11 na forma de "trímeros" (também referidas como "variações de SURROBODY®") foram cotransfectadas com uma cadeia pesada de anticorpo IgG1 de comprimento completo em células CHO-K1 (ATCC CCL-61) para produzir de forma transitório constructos de cadeia leve substituta para análise bioquímica. Especificamente, a VpreB1 e a λ5 humanas de comprimento completo foram clonadas no vetor de expressão de mamífero pCI (Promega, Madison WI). Estes constructos continham seus sinais de secreção previstos nativos. No caso da VpreB1, o peptídeo sinal previsto é constituído pelos aminoácidos 1-20 da SEQ ID NO: 1, para a λ5 a sequência de sinal prevista é constituída dos aminoácidos 1-30 da SEQ ID NO: 5. Para ambas destas proteínas, foram deletadas ptécnicas de suas caudas não estruturais previstas. Para a VpreB1 esta incluía os aminoácidos 122-146 C-terminais da SEQ ID NO: 1 e para a lambda 5 esta incluía os aminoácidos 30-86 N-terminais da SEQ ID NO: 5.

A sequência da sequência de λ5 truncada no "trímero" apresentado na figura 11 como "Lambda 5 dT" é mostrada como a SEQ ID NO: 7. A sequência da sequência de VpreB1 truncada no "trímero" apresentado na figura 11 como "VpreB dT" é mostrada como a SEQ ID NO: 8.

Cada uma das quatro possibilidades de cadeias leves substitutas combinatórias foi co-transfectada com uma cadeia pesada anti-influenza

humana conhecida, contendo uma marcação (tag) de hexa-histidina (His6) C-terminal (SEQ ID NO: 9) e expressa de acordo com as sugestões do fabricante (Invitrogen, Carlsbad CA) em meio com baixo conteúdo de soro. Após 3 dias, os sobrenadantes foram coletados, filtrados e purificados por cromatografia com quelato de níquel (Qiagen, Alemanha). As proteínas purificadas foram então verificadas através da análise de western blot com soro de coelho antipeptídeo (VpreB e λ5) ou anticorpos anti-histidina (Serotec, Raleigh NC). A detecção de proteínas foi visualizada após anti-HRP de coelho (VpreB e λ5) ou anti-HRP de camundongo (cadeia pesada) e do desenvolvimento colorimétrico com o substrato TMB. (figura 12, faixas 1-4)

Adicionalmente, fusões de cadeias leves substitutas (vide a figura 11) foram criadas através da engenharia de uma proteína quimérica composta do gene VpreB1 e o gene λ5 ou o domínio lambda constante da cadeia leve. Especificamente, foi produzida uma proteína fundida de forma recombinante que continha os aminoácidos 1-87 da VpreB (SEQ ID NO: 1) com os aminoácidos 121-209 da proteína λ5 (SEQ ID NO: 5) (SEQ ID NO: 10). Adicionalmente, foi feita uma segunda fusão que continha os aminoácidos 1-87 da VpreB (SEQ ID NO: 1) com o aminoácido 121 C-terminal da região constante da cadeia leve λ do anticorpo (SEQ ID NO: 11). Cada fusão de cadeia leve substituta foi expressa de forma transitória, coletada, purificada e verificada através da análise de western blot, essencialmente como descrito anteriormente. De forma notável, como ambas as fusões continham o epitopo para o soro anti-peptídeo anti-VpreB1, este foi utilizado para a análise de western blot. (figura 12, faixas 5-6)

Exemplo 7

Expressão de constructos de cadeia leve substituta (SURROBODY®) em *E. coli*

Uma vez que as proteínas recombinantes são frequentemente expressas de forma benéfica em bactérias, foi testada a capacidade de produzir constructos de cadeia leve substituta solúveis em sistemas procarióticos. Para se dedicar a isto, as fusões de cadeia leve substituta denominadas de "dímeros" na figura 11 foram clonadas em sistemas de expres-

são/secreção de *E. coli*. Foi utilizado um sistema de expressão que pode ser reprimido por plac, em que as proteínas de mamíferos maduras foram expressas e secretadas no periplasma através da fusão recombinante com sequências líderes procarióticas. Especificamente, as fusões de cadeia leve substituta foram direcionadas para o periplasma através da fusão da sequência codificadora da proteína madura com o terminal C da sequência codificadora líder gIII de m13 (SEQ ID NOs: 12 e 13). A cadeia pesada foi expressa através da fusão da região variável da cadeia pesada de IgG1 e do domínio da região constante de cadeia pesada de um anticorpo anti-influenza ao terminal C da sequência líder pelB (SEQ ID NO: 14). Os plasmídeos que expressam ambas as proteínas foram transformados em células de *E. coli* HB2151 (Stratagene) e expressos durante a noite em meio LB contendo 100 µg/mL de ampicilina e 200 micromolares de IPTG a 30 graus. As células foram coletadas e os lisados periplasmáticos foram preparados, seguindo métodos conhecidos na técnica. Os lisados periplasmáticos foram testados diretamente através da análise de western blot ou purificados como descrito anteriormente (figura 13, painel A).

Uma vez que a cadeia leve substituta é tradicionalmente um componente do receptor de pré-células B ligado à membrana, esta é normalmente encontrada pareada com uma cadeia pesada de classe IgM. Para as finalidades utilitárias próprias, desejava-se comparar a capacidade de parear uma fusão de cadeia leve substituta com uma região do domínio 1 pesado constante com base em IgM versus IgG. Para verificar isto, um domínio 1 pesado constante µ foi substituído (SEQ ID NO: 15) pela região do domínio pesado constante gamma do anticorpo anti-influenza descrito anteriormente. Foi observado, partindo da análise de western blot dos lisados periplasmáticos que o domínio pesado constante com base em IgG (γ) era mais expresso e purificado em níveis maiores que o sistema à base do domínio pesado constante baseado em µ (figura 13, painel B).

Exemplo 8

Expressão de constructos de cadeia leve substituta (SURROBODY®) em fagemídeo m13

Uma vez que as proteínas recombinantes não são apenas expressas de forma proveitosa em bactérias, mas também individualmente e em coleções de bibliotecas diversas na superfície de partículas de vírus bacterianos era desejado produzir constructos de cadeia leve substituta solúveis na superfície de fagemídeos m13. Para se dedicar a isto, fusões de cadeia leve substituta ("dímeros" na figura 11) foram clonadas em sistemas de expressão/secreção de *E. coli*. Para todos os sistemas, foi utilizado um sistema de expressão que pode ser reprimida por pLac descrito anteriormente. Entretanto, neste caso um epitopo E-tag (GAPVPYPDPLEPR) (SEQ ID NO: 16) foi anexado às fusões de cadeia leve substituta, assim como a uma proteína de controle de cadeia leve. As sequências da fusão geneIII VpreB1-lambda5-E tag (Fusão 1) e da fusão geneIII VpreB1-CI-E tag (Fusão 2) são mostradas como as SEQ ID NOs: 12 e 13, respectivamente. Para ancorar os constructos de cadeia pesada ao fagemídeo m13, os constructos de cadeia pesada foram clonadas de forma recombinante, as cadeias pesadas variáveis e as regiões do domínio 1 pesado constante gamma em quadro com o produto do gene III de m13. Especificamente, as proteínas recombinantes continham um peptídeo de hexa-histidina intermediário, o epitopo do peptídeo para o anticorpo anti-c-myc (GEQKLISLEEDL) (SEQ ID NO: 17) e um códon de término âmbar.

Foi verificada a fidelidade da expressão de proteína e da formação de complexos, respectivamente, através de ELISA de captura anti-histidina e anti-E.

A expressão de anticorpos e de "surrobodies" em fagemídeos foi realizada através de métodos padronizados bem conhecidos na técnica. Essencialmente, as células TG-1 transformadas com plasmídeos de expressão foram crescidas até mid log (DO 600 de ~0,3) em meio 2-YT suplementado com 100 µg/mL de ampicilina e repressão com 2% de glicose e então infectadas com o fago auxiliador m13K07 e então crescidas durante a noite em meio 2-YT suplementado com 100 µg de ampicilina, 70 µg/mL de canamicina e 200 micromolares de IPTG. Os sobrenadantes ou os precipitados contendo fagos e o fago ressuspenso em PBS foram utilizados para o ELISA de

captura em fagos. O ELISA de captura em fagos foi realizado através do revestimento de placas para microtitulação com anticorpos anti-histidina (Serotec) ou anti-E (Abcam) e então da detecção da ligação com anticorpos anti-peroxidase de m13 (Pharmacia), seguida pela visualização colorimétrica com o substrato TMB. Nestes casos, foi observada a captura específica do fago através de ambos os métodos, sustentando a fusão de expressão de proteínas com alta fidelidade ao fago através da associação de cadeias pesadas e de cadeias leves substitutas estáveis. Os resultados são mostrados na figura 14.

Exemplo 9

Ligação ao antígeno de constructos de cadeia leve substituta expressas em células de mamífero

Como parecia que as variações de cadeias leves substitutas formavam complexos facilmente detectáveis após a cromatografia com quelato de níquel, sua capacidade de se ligar ao antígeno original do parceiro de ligação da cadeia pesada cognata foi testada. A expressão transitória e a purificação foram realizadas como descrito anteriormente. A ligação ao antígeno foi testada por ELISA. Sucintamente, poços de microtitulação foram revestidos com preparações do vírus H5N1 Vietnam 12-3/04 inativado (USFDA – CBER, padrão de antígeno), bloqueados e então incubados com proteínas purificadas diluídas em série quantificadas. Após a lavagem, os complexos foram detectados com anticorpos conjutados com peroxidase anti-Fc humano. Finalmente, a ligação foi visualizada de forma colorimétrica e quantificada com o desenvolvimento do substrato TMB (vide a figura 15).

Adicionalmente, os sobrenadantes de transfecções transitórias foram similarmente testados não-diluídos em relação à ligação ao antígeno e mostrados na figura 16. Após a lavagem, os complexos de cadeias leves substitutas foram detectados tanto com soro anti-peptídeo anti-VpreB1 quanto com anticorpos secudários conjugados com peroxidase anti-coelho ou anticorpos conjugados com peroxidase anti-Fc humano e então visualizados de forma colorimétrica e quantificados com o desenvolvimento do substrato TMB.

Exemplo 10

Ligação ao antígeno de constructos de cadeia leve substituta expressas em *E. coli*

Devido ao fato de que as fusões de cadeia leve substituta pareciam formar complexos estáveis, era desejado estabelecer se tais fusões pareadas com uma cadeia pesada e anticorpo anti-influenza se ligariam ao vírus cognato do anticorpo. Para testar a ligação, os lisados periplasmáticos foram preparados como descrito anteriormente. Os lisados foram então submetidos à ligação ao antígeno em ELISA, essencialmente como descrito anteriormente, exceto que a ligação foi detectada com um anticorpo monoclonal para um epitopo de hexa-histidina anexado no terminal C da cadeia pesada ou para uma E-tag anexada no terminal C da fusão de cadeia leve substituta por anticorpos purificados por afinidade policlonais. A detecção do epitopo foi realizada por anticorpos conjugados com peroxidase anti camundongo ou anti-coelho. Finalmente, a ligação foi visualizada de forma colorimétrica e quantificada com o desenvolvimento do substrato TMB. Os resultados são mostrados na figura 17.

Exemplo 11

Ligação ao antígeno de constructos exibidos em fagos de cadeias leves substitutas

Devido ao fato de que era possível produzir variações de cadeias leves substitutas em sistemas heterólogos e uma vez que as coleções exibidas em fagos são desejáveis para a descoberta e a engenharia de proteínas futuras, era desejado determinar se as variações e/ou as fusões de cadeias leves substitutas eram facilmente exibidas na superfície do fago m13 na forma de complexos associados com o gene III. As variações (SEQ ID NOs: 18-22) e as fusões descritas anteriormente (SEQ ID NOs: 12 e 13) foram coexpressas com qualquer uma de duas cadeias pesadas de anticorpo anti-influenza (SEQ ID NOs: 19 e 14) como descrito anteriormente e a ligação seguiu essencialmente as condições também descritas anteriormente. Sucintamente, poços para microtitulação foram revestidos com o vírus H5N1 Vietnam 1203/04 e foi permitido que os fagemídeos se ligassem e então fo-

ram lavados e detectados diretamente através de anticorpos conjugados com peroxidase anti-m13. A ligação foi determinada de forma quantitativa após a formação do produto do substrato colorimétrico com TMB. Os resultados são mostrados nas figuras 18 e 19.

Exemplo 12

Constructos, seleção e ELISA clonal de bibliotecas de constructos de cadeia leve substituta em fagos

Uma abordagem iterativa utilizando bibliotecas combinatórias de anticorpos foi empregada para gerar e testar constructos de cadeia leve substituta que se ligam ao antígeno. Sucintamente, foram criadas bibliotecas combinatórias de anticorpos preparadas partindo da medula óssea de sobreviventes ao influenza aviário H5N1. Estas bibliotecas foram verificadas contra a proteína hemaglutinina do vírus H5N1 para dois ciclos de seleção. A seguir, o plasmídeo de fagemídeo foi amplificado e purificado. As regiões variáveis de cadeia pesada foram isoladas pela digestão de restrição desta preparação de plasmídeo e clonadas em quadro com o domínio 1 pesado constante para formar uma fusão recombinante com a proteína de revestimento do gene III de m13 para a exibição em fagemídeo. De maneira importante, foram utilizados dois plasmídeos receptores que coexpressavam uma fusão de cadeia leve substituta compreendida de VpreB1 e lambda 5 (Fusão de SLC 1) (SEQ ID NO: 10) ou VpreB1 e um domínio de lambda constante (SEQ ID NO: 11) proveniente da cadeia leve lambda clássica (Fusão de SLC 2). A biblioteca de fusão 1 produziu $3{,}84 \times 10^7$ transformantes independentes, enquanto que a biblioteca de fusão 2 produziu $7{,}8 \times 10^7$ transformantes. Ambas as bibliotecas foram verificadas independentemente ao longo de dois ciclos e ambas exibiam enriquecimento significativo em relação ao básico (Fusão 1 = 5x, Fusão 2 = 20x) que aumentava em um segundo ciclo de "panning" (Fusão 1 = 97x, Fusão 2 = 48x).

Para testar através de ELISA a ligação ao antígeno clonal, os fagos de ambos os ciclos e de ambas as bibliotecas foram transferidos para a cepa de *E. coli* HB2151 para produzir proteínas de fusão com surrobody solúveis. Sucintamente, os clones de HB2151 foram crescidos e induzidos a

produzir surrobodies solúveis. Especificamente, as colônias foram cultivadas durante a noite em meio 2-YT suplementado com 100 µg/mL de ampicilina e 200 micromolares de IPTG durante a noite a 30 graus, os lisados periplasmáticos, como descrito anteriormente. Os lisados periplasmáticos resultantes foram testados por ELISA, essencialmente como apresentado anteriormente.

O número de transformantes e a porcentagem de clones positivos para as duas fusões, nos ciclos 1 e 2 de "panning" são mostrados na figura 20 e os dados da análise clonal para os Ciclos 1 e 2 dos clones das bibliotecas de Fusão 1 e de Fusão 2 são mostrados nas figuras 21 e 22.

Exemplo 13

Fusões de cadeia leve substituta para aumentar a meia-vida no soro

A meia-vida de um fragmento de anticorpo *in vivo* é consideravelmente estendida quando este faz ptécnica de uma fusão com uma cadeia pesada intacta e completa que inclui todos os domínios constantes de cadeia pesada, não apenas os necessários para formar uma ligação estável ao fragmento do antígeno. No caso de IgG isto significa a inclusão de domínios CH1, CH2 e CH3. Em particular está bem estabelecido que CH2 e CH3 conferem a maior ptécnica deste efeito *in vivo*. Na verdade, a fusão destes domínios CH2 e CH3 com proteínas heterólogas é tipicamente suficiente para aumentar as potências e PK/PD destas moléculas quiméricas comparadas com as moléculas originais. Similarmente fusões funcionais com qualquer uma ou com ambas VpreB e λ5 se beneficiam através desta associação com os domínios constantes da cadeia pesada.

Para o tratamento de diabetes do tipo II, a administração do peptídeo 1 similar ao glucagon (ou GLP-1) beneficia os indivíduos através da indução da secreção de insulina dependente de glicose no pâncreas, melhorando assim o controle de glicose em tais pacientes. Entretanto, um peptídeo GLP-1 de vida longa é uma meta desejável. Uma vez que as caudas das cadeias leves substitutas são distintas e acessíveis, esta meta poderia ser realizada através da fusão de forma recombinante da porção de GLP-1 ativo

com o terminal C da cauda de VpreB1 (SEQ ID NOs: 23 e 24) ou com a cauda N-terminal de λ5 (SEQ ID NOs: 25 e 26). No caso de uma fusão com λ5, esta pode ser expressa na presença ou na ausência de VpreB1 e até mesmo na presença ou na ausência do domínio pesado variável, como apresentado na figura 11. As fusões com VpreB1 podem ser similarmente produzidas na presença ou na ausência de λ5 e possivelmente com ou sem o domínio da cadeia pesada de CH1. Similarmente, outras fusões benéficas com fator de crescimento, citocina, receptor e enzima podem ser criadas. Em todos estes casos a ligação não é uma necessidade da cadeia leve substituta ou de componentes de SURROBODY®, mas ao invés disso, pode ser conferida inteiramente ou em grande ptécnica pelo elemento fundido com a cadeia leve substituta heteróloga.

Embora, na descrição precedente, a invenção seja ilustrada com referência a certas modalidades esta não é tão limitada. De fato, várias modificações da invenção em adição àqueles mostrados descritos aqui se tornarão aparente aqueles versados na técnica a partir da descrição precedente e estão dentro do escopo das reivindicações em anexo.

Exemplo 14

Determinação da afinidade de Constructos de cadeia leve substituta que se ligam à Hemaglutinina

Para determinar as afinidades de constructos de fusão de cadeias leves substitutas (SURROBODIES®, vide a figura 11) vários surrobodies foram superexpressos e purificados em *E. coli* e comparados com os Fabs originais dos quais as cadeias pesadas foram primeiramente identificadas. As afinidades foram determinadas por Bio-Layer Interferometry em um Bio-Forte Octet essencialmente como a seguir. Em primeiro lugar, 100 μg de proteína hemaglutinina purificada foram biotinilados em um excesso molar de 20:1 utilizando biotina Pierce No-Weigh PEO4 (cat# 21329) de acordo com as instruções do fabricante, incubados à temperatura ambiente durante 1-3 horas com mistura intermitente e então incubados durante a noite a 4C. O excesso de biotina foi removido através da coluna de centrifugação por exclusão de tamanho e trocado para PBS. A seguir, os constructos de ca-

deia leve substituta e os Fabs de ligação à HA foram purificados por FPLC utilizando cromatografia por afinidade com Ni^{2+}, dessalinizados para remover o excesso de imidazol, concentrados e quantificados por ELISAs quantitativos de cadeias leves (Bethel Labs, cat# E80-115-κ e E80-116-λ) que são realizados de acordo com as instruções do fabricante. Finalmente, as afinidades foram determinadas através da análise de uma faixa de concentrações de amostras que são tipicamente 15 nM-500 nM em diluições em série de 2 vezes. As amostras foram incubadas com biossensores revestidos com a proteína HA durante até 15 minutos, então incubadas no diluente de amostra durante até 1 hora. Todas estas etapas foram realizadas com rotação de placas das amostras a 1500 RPM. A associação foi medida durante a incubação de Fab com os biossensores revestidos com HA e a dissociação é medida na incubação no diluente de amostra após a ligação. As afinidades são mostradas na Tabela a seguir

Clone	**Fusão 1 VpreB1-Lambda5**	**Fusão 1 VpreB1-lambda constante**	**Fab**
F5	250-400 pM	150-270 pM	1 pM
B11	31-180 pM	Não determinado	13 pM

Todas as referências citadas ao longo de todo o relatório descritivo e as referências citadas aqui, são expressamente incorporadas aqui como referência em sua totalidade.

REIVINDICAÇÕES

1. Polipeptídeo que compreende uma sequência de VpreB e/ou uma sequência de λ5 conjugada com uma sequência de aminoácidos heterogênea,, em que o dito polipeptídeo é capaz de se ligar a um alvo.

2. Polipeptídeo de acordo com a reivindicação 1, que compreende uma sequência de VpreB.

3. Polipeptídeo de acordo com a reivindicação 2, em que a dita sequência de VpreB é selecionada do grupo que consiste em uma sequência nativa de VpreB1, uma sequência nativa de VpreB2, uma sequência nativa de VpreB3 e fragmentos e variações das mesmas.

4. Polipeptídeo de acordo com a reivindicação 3, em que a dita sequência nativa de VpreB é selecionada do grupo que consiste em VpreB1 humana da SEQ ID NO: 1, VpreB2 de camundongo das SEQ ID NOS: 2 e 3, VpreB3 humana da SEQ ID NO: 4 e fragmentos e variações das mesmas.

5. Polipeptídeo de acordo com a reivindicação 2, em que a dita sequência de aminoácidos heterogênea compreende uma sequência de λ5.

6. Polipeptídeo de acordo com a reivindicação 5, em que a dita sequência de aminoácidos heterogênea compreende toda ou ptécnica de uma λ5 humana da SEQ ID NO: 5 ou de um polipeptídeo similar à λ5 humana da SEQ ID NO: 6.

7. Polipeptídeo de acordo com a reivindicação 5, em que a dita sequência de λ5 é fundida com a dita sequência de VpreB.

8. Polipeptídeo de acordo com a reivindicação 2 que compreende uma fusão de uma sequência de VpreB com uma sequência de aminoácidos heterogênea.

9. Polipeptídeo de acordo com a reivindicação 8, em que a dita sequência de aminoácidos heterogênea é uma sequência de λ5.

10. Polipeptídeo de acordo com a reivindicação 9, em que a dita sequência de VpreB é selecionada do grupo que consiste em VpreB1 humana da SEQ ID NO: 1, VpreB2 de camundongo das SEQ ID NOS:2 e 3 e VpreB3 humana da SEQ ID NO: 4 e fragmentos e variações das mesmas.

11. Polipeptídeo de acordo com a reivindicação 10, em que a di

ta sequência de λ5 é uma sequência de uma λ5 humana da SEQ ID NO: 5, um polipeptídeo similar à λ5 da SEQ D NO:6 ou um fragmento ou uma variação dos mesmos.

12. Polipeptídeo de acordo com a reivindicação 9, em que a dita fusão ocorre na ou ao redor das regiões análogas à CDR3 da dita sequência de VpreB e λ5, respectivamente.

13. Polipeptídeo de acordo com a reivindicação 8, em que a dita sequência de aminoácidos heterogênea compreende uma sequência de região variável de cadeia leve de anticorpo.

14. Polipeptídeo de acordo com a reivindicação 13, em que a dita sequência de região variável de cadeia leve de anticorpo é fundida com a dita sequência de VpreB em um sítio análogo a uma região de CDR3 de cadeia leve de anticorpo.

15. Polipeptídeo de acordo com a reivindicação 13, em que a região de CDR3 da dita sequência de região variável de cadeia leve de anticorpo é fundida com a dita sequência de VpreB em um sítio análogo à dita região de CDR3.

16. Polipeptídeo de acordo com a reivindicação 15,, em que a dita cadeia leve de anticorpo é uma cadeia λ.

17. Polipeptídeo de acordo com a reivindicação 15, em que a dita cadeia leve de anticorpo é uma cadeia κ.

18. Polipeptídeo de acordo com a reivindicação 13, em que a dita sequência de aminoácidos heteróloga compreende ainda uma sequência da região constante de cadeia leve do anticorpo.

19. Polipeptídeo de acordo com a reivindicação 18, em que a dita região constante sequência é a região constante inteira de uma cadeia leve de anticorpo.

20. Polipeptídeo de acordo com a reivindicação 1 que compreende uma sequência de λ5.

21. Polipeptídeo de acordo com a reivindicação 20, em que a dita sequência de λ5 é uma sequência de uma λ5 humana da SEQ ID NO: 5 ou polipeltídeo similar à λ5 humana da SEQ ID NO: 6 ou um fragmento ou

uma variação dos mesmos.

22. Polipeptídeo de acordo com a reivindicação 21, em que a dita sequência de aminoácidos heterogênea é uma sequência de VpreB conjugada com a dita sequência de λ5.

23. Polipeptídeo de acordo com a reivindicação 22, em que a dita conjugação é uma fusão das ditas sequências de λ5 e VpreB.

24. Polipeptídeo de acordo com a reivindicação 22, em que a dita conjugação é uma ligação covalente entre as ditas sequências de λ5 e VpreB.

25. Polipeptídeo de acordo com a reivindicação 24, em que a dita ligação covalente é formada através da conexão de um peptídeo ou uma sequência de polipeptídeo.

26. Polipeptídeo de acordo com a reivindicação 1 que compreende uma sequência de VpreB e uma sequência de λ5, em que a dita conjugação é uma associação não-covalente e, em que pelo menos uma das ditas sequências de VpreB e λ5 é outra sem ser uma sequência de VpreB e λ5 nativa de comprimento completo, respectivamente.

27. Polipeptídeo de acordo com a reivindicação 26, em que pelo menos uma das ditas sequências de VpreB e λ5 é um fragmento ou uma variação de uma sequência de VpreB e λ5 nativa, respectivamente.

28. Polipeptídeo de acordo com a reivindicação 1, em que o dito polipeptídeo é adicionalmente conjugado com uma segunda sequência de aminoácidos heterogênea.

29. Polipeptídeo de acordo com a reivindicação 28 que compreende uma fusão de uma sequência de VpreB com uma sequência de λ5, associada de forma covalente a dita segunda sequência de aminoácidos heterogênea.

30. Polipeptídeo de acordo com a reivindicação 29, em que a dita segunda sequência heterogênea de polipeptídeo é uma sequência de cadeia pesada de anticorpo que compreende uma região variável.

31. Polipeptídeo de acordo com a reivindicação 30, em que a dita sequência de cadeia pesada de anticorpo é conjugada a uma fusão da

dita sequência de VpreB e a dita sequência de λ5 através de um ligante peptídico.

32. Polipeptídeo de acordo com a reivindicação 30, em que a dita sequência de cadeia pesada de anticorpo é conjugada a uma fusão da dita sequência de VpreB e a dita sequência de λ5 através da associação não-covalente, para formar um complexo dimérico.

33. Polipeptídeo de acordo com a reivindicação 32, em que a sequência de região variável de cadeia pesada de anticorpo se liga ao mesmo alvo que o dito polipeptídeo.

34. Polipeptídeo de acordo com a reivindicação 32, em que a dita sequência de região variável de cadeia pesada de anticorpo se liga a um alvo diferente do alvo ao qual o dito polipeptídeo se liga.

35. Polipeptídeo de acordo com a reivindicação 34, em que o dito polipeptídeo se liga a um antígeno de tumor e a sequência de anticorpo da região variável se liga às células efetoras.

36. Polipeptídeo de acordo com a reivindicação 26 que compreende ainda uma sequência de cadeia pesada de anticorpo que compreende uma região variável, associada de forma não-covalente à sequência de VpreB e sequências de λ5 associadas de forma não-covalente, para formar um complexo trimérico.

37. Polipeptídeo de acordo com a reivindicação 36, em que a dita cadeia pesada de anticorpo compreende sequências da região variável que se ligam ao mesmo alvo que o dito polipeptídeo.

38. Polipeptídeo de acordo com a reivindicação 36, em que a dita cadeia pesada de anticorpo compreende sequências da região variável que se ligam a um alvo diferente do alvo ao qual o dito polipeptídeo se liga.

39. Polipeptídeo de acordo com a reivindicação 38, em que o dito polipeptídeo se liga a um antígeno de tumor e a dita sequência da região variável se liga às células efetoras.

40. Polipeptídeo de acordo com a reivindicação 1, em que as regiões análogas à CDR da dita sequência de VpreB e/ou da dita sequência de λ5 são engenheiradas através do enxerto de sequências de CDR corres-

pondentes de um anticorpo terapêutico.

41. Polipeptídeo de acordo com a reivindicação 1, em que o alvo é um antígeno.

42. Polipeptídeo de acordo com a reivindicação 1, em que o alvo é um antígeno viral.

43. Polipeptídeo de acordo com a reivindicação 42, em que o alvo é um vírus influenza A.

44. Polipeptídeo de acordo com a reivindicação 43, em que o dito polipeptídeo neutraliza o dito vírus influenza A.

45. Biblioteca que compreende um polipeptídeo como definido em qualquer uma das reivindicações 1 até 44.

46. Biblioteca que compreende um conjugado de uma sequência de VpreB e uma sequência de λ5 associado a uma cadeia pesada de anticorpo.

47. Biblioteca de acordo com a reivindicação 46, em que o dito conjugado é uma fusão das ditas sequências de VpreB e λ5.

48. Biblioteca de acordo com a reivindicação 46, em que o dito conjugado é uma associação não-covalente das ditas sequências de VpreB e λ5.

49. Biblioteca de acordo com a reivindicação 46, em que o dito conjugado é uma ligação covalente das ditas sequências de VpreB e λ5 através de um ligante peptídico.

50. Biblioteca de acordo com a reivindicação 46, em que a dita sequência de região variável de cadeia pesada de anticorpo está associada de forma não-covalente ao dito conjugado.

51. Biblioteca de acordo com a reivindicação 46, em que a dita sequência de região variável de cadeia pesada de anticorpo está associada de forma covalente ao dito conjugado.

52. Biblioteca de acordo com a reivindicação 46, em que a cadeia pesada de anticorpo compreende sequências da região variável que se ligam ao mesmo alvo que o dito conjugado.

53. Biblioteca de acordo com a reivindicação 46, em que a dita

cadeia pesada de anticorpo compreende sequências da região variável que se ligam a um alvo diferente do alvo ao qual o dito conjugado se liga.

54. Biblioteca de acordo com a reivindicação 53, em que o dito conjugado se liga a um antígeno de tumor e a dita sequência da região variável se liga às células efetoras.

55. Biblioteca de acordo com a reivindicação 45 na forma de um mostruário.

56. Biblioteca de acordo com a reivindicação 55, em que o dito mostruário é selecionado do grupo que consiste em exibição em fagos, exibição bacteriana, exibição em leveduras, exibição de ribossomos, exibição de mRNA, exibição de DNA, exibição em células de mamífero, exibição em esporos, exibição viral, exibição baseada na ligação de proteína-DNA e exibição em microesferas.

57. Biblioteca de acordo com a reivindicação 46 na forma de um display.

58. Biblioteca de acordo com a reivindicação 57, em que o dito display é selecionado do grupo que consiste em exibição em fagos, exibição bacteriana, exibição em leveduras, exibição de ribossomos, exibição de mRNA, exibição de DNA, exibição em células de mamífero, exibição em esporos, exibição viral, exibição baseada na ligação de proteína-DNA e exibição em microesferas.

59. Biblioteca que compreende sequências de cadeia leve substituta.

60. Biblioteca de acordo com a reivindicação 59 na forma de um display.

61. Biblioteca de acordo com a reivindicação 59, em que o dito display é selecionado do grupo que consiste em exibição em fagos, exibição bacteriana, exibição em leveduras, exibição de ribossomos, exibição de mRNA, exibição de DNA, exibição em células de mamífero, exibição em esporos, exibição viral, exibição baseada na ligação de proteína-DNA e exibição em microesferas.

62. Biblioteca de acordo com a reivindicação 45, 46 ou 59 que

compreende ainda pelo menos uma funcionalidade adicional anexada ou embutida nos membros da dita biblioteca.

63. Biblioteca de acordo com a reivindicação 62, em que a dita funcionalidade adicional é fornecida por sequências de anticorpos, peptídeos ou polipeptídeos.

64. Biblioteca de acordo com a reivindicação 63, em que as sequências de polipeptídeos são sequências receptoras ou ligantes.

65. Biblioteca de acordo com a reivindicação 63, em que as ditas sequências de anticorpos, peptídeos ou polipeptídeos são membros de uma biblioteca de anticorpos, peptídeos ou polipeptídeos.

66. Biblioteca de acordo com a reivindicação 65, em que a dita biblioteca de peptídeos é uma biblioteca de sequências peptídicas aleatórias.

67. Biblioteca de acordo com a reivindicação 66, em que pelo menos ptécnica das ditas sequências peptídicas possui especificidade de ligação a um antígeno-alvo.

68. Biblioteca de acordo com a reivindicação 62, na forma de um display.

69. Biblioteca de acordo com a reivindicação 68, em que o dito display é selecionado do grupo que consiste em exibição em fagos, exibição bacteriana, exibição em leveduras, exibição de ribossomos, exibição de mRNA, exibição de DNA, exibição em células de mamífero, exibição em esporos, exibição viral, exibição baseada na ligação de proteína-DNA e exibição em microesferas.

70. Biblioteca que compreende uma coleção de sequências de cadeia leve substituta associada a sequências de região variável de cadeia pesada de anticorpo.

71. Biblioteca de acordo com a reivindicação 70, em que as ditas sequências de cadeia leve substituta possuem especificidade de ligação a um ou mais alvos.

72. Biblioteca de acordo com a reivindicação 71, em que as ditas sequências de cadeia leve substituta possuem especificidade de ligação ao

mesmo alvo.

73. Biblioteca de acordo com a reivindicação 71, em que as ditas sequências de cadeia leve substituta possuem especificidade de ligação a pelo menos dois alvos diferentes.

74. Biblioteca de acordo com a reivindicação 71, em que as ditas sequências de cadeia leve substituta possuem especificidade de ligação a um grande número de alvos.

75. Biblioteca de acordo com a reivindicação 70, em que as ditas sequências de cadeia leve substituta compreendem sequências de VpreB e/ou sequência de λ5.

76. Biblioteca de acordo com a reivindicação 75, em que as ditas sequências de VpreB são selecionadas do grupo que consiste em VpreB1 humana (SEQ ID NO: 1), VpreB2 de camundongo (SEQ ID NOS: 2 e 3) e VpreB3 humana (SEQ ID NO: 4) sequências e fragmentos e variações das mesmas.

77. Biblioteca de acordo com a reivindicação 75, em que as ditas sequências de λ5 são selecionadas do grupo que consiste em λ5 humana da SEQ ID NO: 5, polipeptídeo similar à λ5 humana da SEQ ID NO: 6 e fragmentos e variações dos mesmos.

78. Biblioteca de acordo com a reivindicação 75, em que as ditas sequências de VpreB e λ5 estão associadas de forma não-covalente uma com a outra.

79. Biblioteca de acordo com a reivindicação 75, em que as ditas sequências de VpreB e λ5 estão conectadas de forma covalente uma com a outra.

80. Biblioteca de acordo com a reivindicação 79, em que as ditas sequências de VpreB e λ5 estão fundidas diretamente uma com a outra.

81. Biblioteca de acordo com a reivindicação 75 que compreende ainda pelo menos uma funcionalidade adicional anexada a ou embutida nos membros da dita biblioteca.

82. Biblioteca de acordo com a reivindicação 81, em que a dita funcionalidade adicional é fornecida por sequências de anticorpos, peptídeos

ou polipeptídeos.

83. Biblioteca de acordo com a reivindicação 82, em que as sequências de polipeptídeos são sequências receptoras ou ligantes.

84. Biblioteca de acordo com a reivindicação 82, em que as ditas sequências de anticorpos, peptídeos ou polipeptídeos são membros de uma biblioteca de anticorpos, peptídeos ou polipeptídeos.

85. Biblioteca de acordo com a reivindicação 84, em que a dita biblioteca de peptídeos é uma biblioteca de sequências peptídicas aleatórias.

86. Biblioteca de acordo com a reivindicação 85, em que pelo menos ptécnica das ditas sequências peptídicas possuem especificidade de ligação a um antígeno-alvo.

87. Biblioteca de acordo com a reivindicação 70 na forma de um display.

88. Biblioteca de acordo com a reivindicação 87, em que o dito display é selecionado do grupo que consiste em exibição em fagos, exibição bacteriana, exibição em leveduras, exibição de ribossomos, exibição de mRNA, exibição de DNA, exibição em células de mamífero, exibição em esporos, exibição viral, exibição baseada na ligação de proteína-DNA e exibição em microesferas.

Fig 1

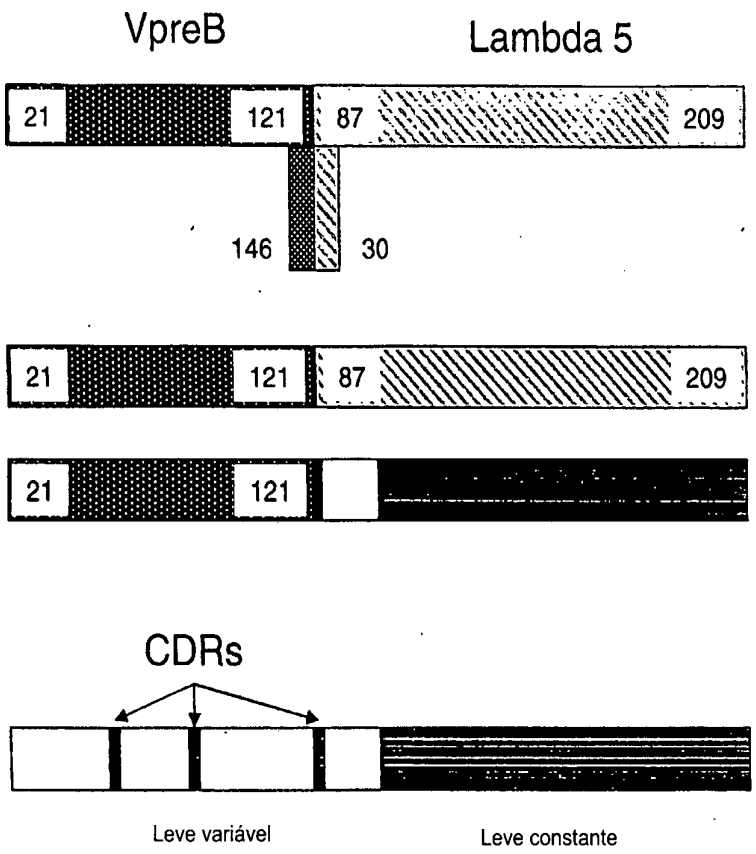
Alinhamento de cadeias leves substitutas com cadeias leves lambda variáveis e constantes

```
                                                                CDR1
                          1                                                                  65
NM_007128 VPREB1     (1)  MSWAPVLLMLFVYCTGCGPQPVLHQPPAMSSALGTTIRLTCTLRNDHD-IGVYSVYWYQQRPGHP
          VL1_1b     (1)  -----------------GSQSVLTQPPSVSAAPGQKVTISCSGSSSNI--GNNYVSWYQQLPGTA
CAA01962 Lambda5     (1)  --------------------MKLRVGQTLGTIPRQCEVLLLLLLLGLVDGVHHILSPSSAERSRA

                          CDR2                                          CDR3
                          66                                                                 130
NM_007128 VPREB1    (65)  PRFLLRYFSQSDKSQGPQVPPRFSGSKDVARNRGYLSISELQPEDEAMYYCAMGARSSEKEERER
          VL1_1b    (47)  PKLLIYDNNK----RPSGIPDRFSGS--KSGTSATLGITGLQTGDEADYYCGTWDSSLSAVVFGG
CAA01962 Lambda5    (46)  VGPGASVGSN--------------RPSLWALPGRLLFQIIPRGAGPRCSPHRLPSKPQFWYVFGG
Vlambda constant     (1)  ------------------------------------------------------------G

                          131                                                                195
NM_007128 VPREB1   (130)  EWEEEMEPTAARTRVP-----------------------------------------------
CAA01962 Lambda5    (98)  GTQLTILGQPKSDPLVTLFLPSLKNLQPTRPHVVCLVSEFYPGTLVVDWKVDGVPVTQGVETTQP
Vlambda constant     (2)  GTKLTVLRQPKAAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADGSPVKAGVETTTP

                          196                                        242
Vlambda constant    (67)  SKQSNNKYAASSYLSLTPEQWKSHKSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS
CAA01962 Lambda5   (163)  SKQTNNKYMVSSYLTLISDQWMPHSRYSCRVTHEGNTVEKSVSPAECS
```

- VPREB1 compartilha alguma similaridade de sequência com as regiões variáveis de cadeia leve lambda clássicas
- Lambda 5 compartilha similaridade com regiões constantes lambda V e com a região Estrutural 4
- A cadeia leve substituta possui regiões que são análogas às regiões de CDR

Fig 2

Cadeia leve substituta e construções de fusão



Cadeia leve substituta

- Dois polipeptídeos

Fusões de cadeia leve substituta

- Fusão no sítio análogo à CDR3
- Fundir opcionalmente VpreB com a CDR3 da cadeia leve lambda

Cadeia leve recombinada clássica

- Proteína isolada derivada da união V-J

Fig 3

Deleção da cadeia leve substituta e construções de cadeia isolada

Podem ser utilizadas individualmente ou com outra proteína tal como uma cadeia pesada

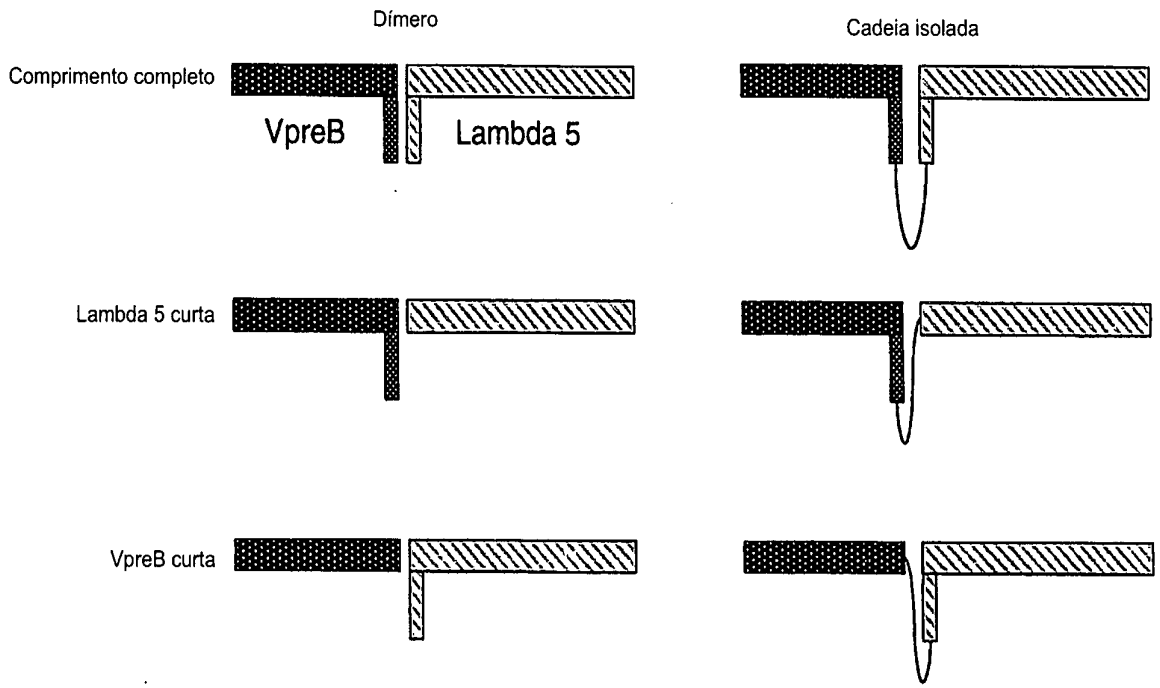


Fig 4

Incorporação de diversidade funcional combinatória
em construções de Cadeia Leve Substituta

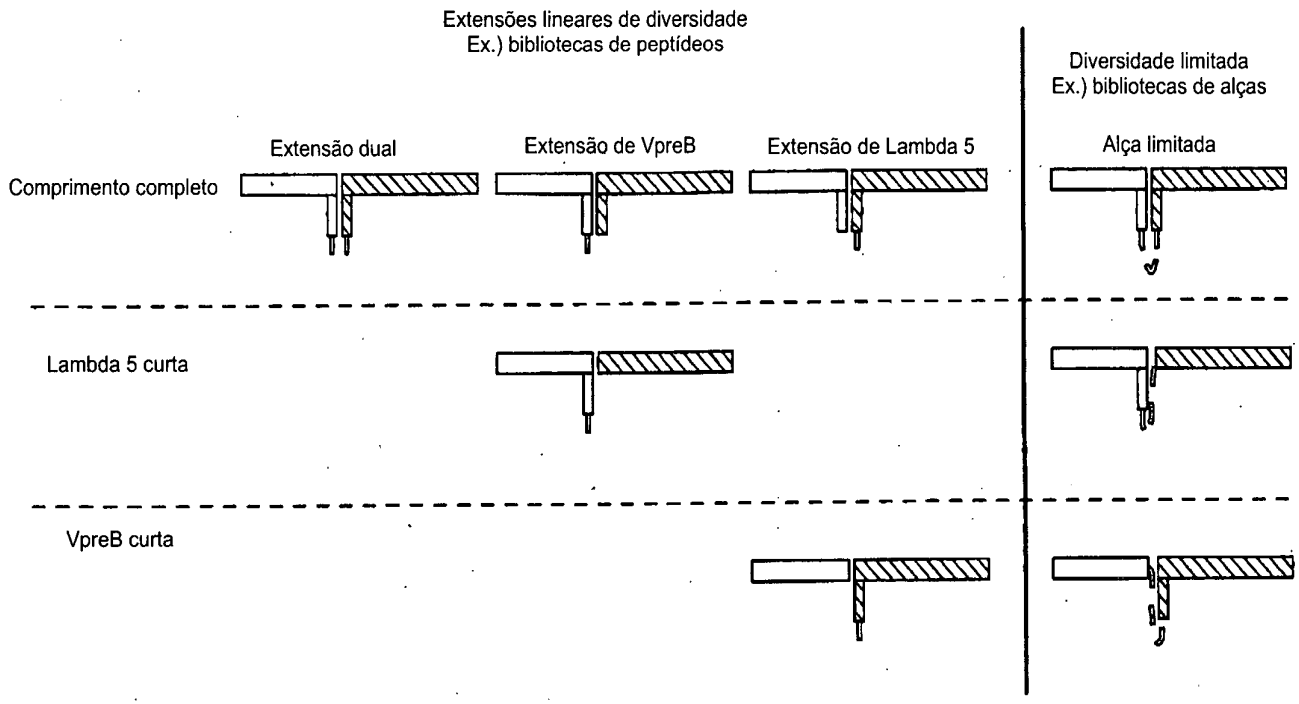


Fig 5

Tipos de construções de cadeia leve substituta

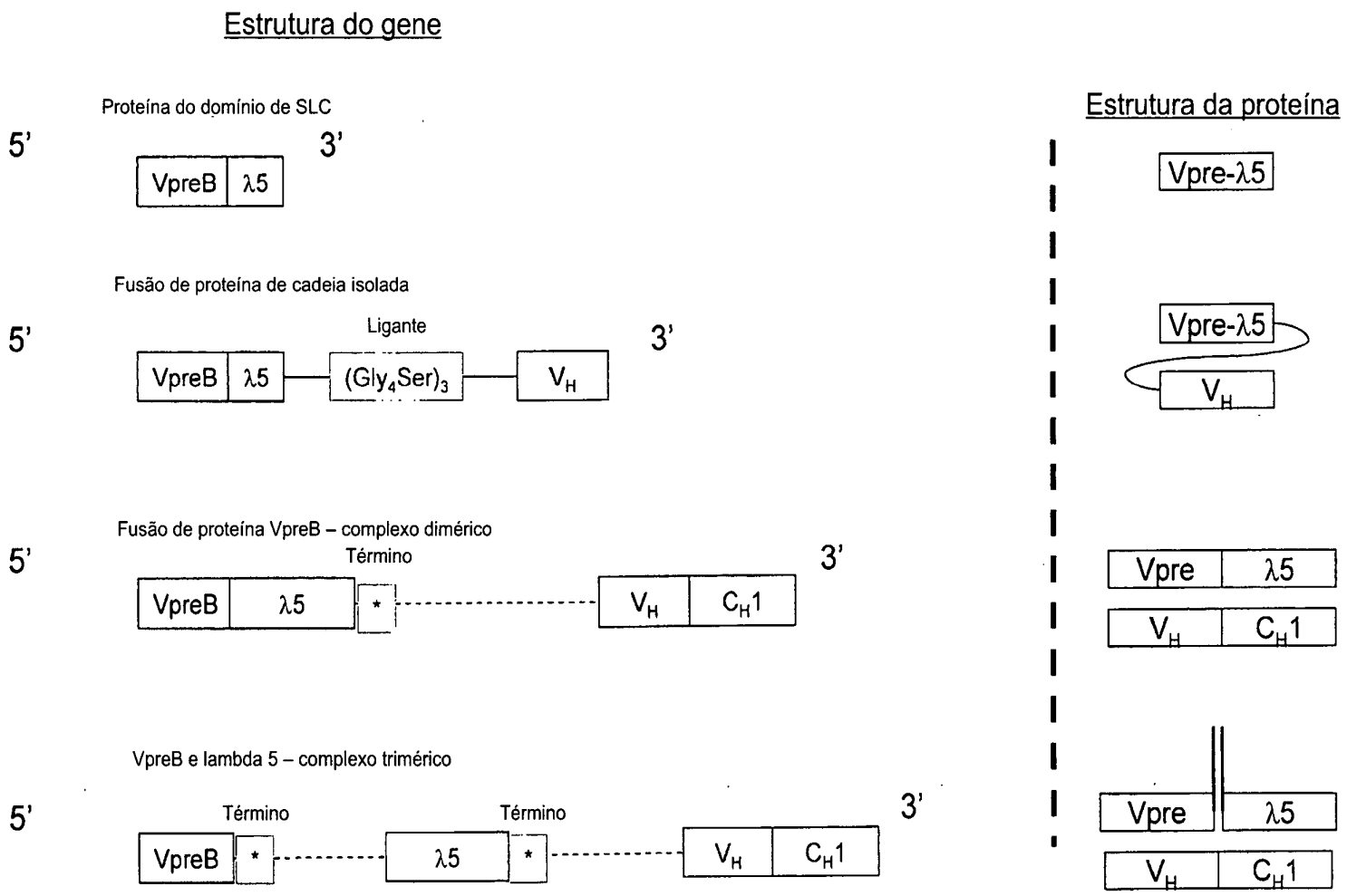


Fig 6

Alinhamento de SLC com Genes VL5

```
                                  1                                                  45
NM_007128 hu VPREB1      (1)  MSWAPVLLMLFVYCTGCGPQPVLHQPPAMSSALGTTIRKTCTKRN
                   5b    (1)  --------------------QPVLTQPSSHSASSGASVRLTCMLSS
                   5c    (1)  --------------------QAVLTQPASLSASPGASASLTCTLRS
                   5e    (1)  --------------------QPVLTQPPSSSASPGESARLTCTLPS

                                 46                                                  90
NM_007128 hu VPREB1     (46)  DHDIGVYSVYWYQQRPGHPPRFKKRYFSQSDKSQGPQVPPRFSGS
                   5b   (27)  GFSVGDFWIRWYQQKPGNPPRYLLYYHSDSNKGQGSGVPSRFSGS
                   5c   (27)  GINVGTYRIYWYQQKPGSPPQYLLRYKSDSDKQQGSGVPSRFSGS
                   5e   (27)  DINVGSYNIYWYQQKPGSPPRYLLYYYSDSDKGQGSGVPSRFSGS

                                 91                                                 135
NM_007128 hu VPREB1     (91)  KDVARNRGYLSISELQPEDEAMYYCAMGARSSEKEEREREWEEEM
                   5b   (72)  NDASANAGILRISGLQPEDEADYYCGTWHSNSKT-----------
                   5c   (72)  KDASANAGILLISGLQSEDEADYYCMIWHSSAS-----------
                   5e   (72)  KDASANTGILLISGLQSEDEADYYCMIWPSNAS-----------

                                 136     146
NM_007128 hu VPREB1    (136)  EPTAARTRVP-
                   5b  (106)  -----------
                   5c  (105)  -----------
                   5e  (105)  -----------
```

VPreB1 compartilha apenas 56% - 62% (aminoácidos 2-97) com as linhagens germinativas de VL lambda 5

Fig 7

Alinhamento de SLC com Lambda Constante

```
                          1                                                  50
                          1                                                  50
CAA01962 Lambda5     (1)  MKLRVGQTLGTIPRQCEVLLLLLLLGLVDGVHHILSPSSAERSRAVGPGA
Lambda constante     (1)  --------------------------------------------------
                          51                                                100
CAA01962 Lambda5    (51)  SVGSNRPSLWALPGRLLFQIIPRGAGPRCSPHRLPSKPQFWYVFGGGTQL
Lambda constante     (1)  ----------------------------------------------GTKL
                          101                                               150
CAA01962 Lambda5   (101)  TILGQPKSDPLVTLFLPSLKNLQPTRPHVVCLVSEFYPGTLVVDWKVDGV
Lambda constante     (5)  TVLRQPKAAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADGS
                          151                                               200
CAA01962 Lambda5   (151)  PVTQGVETTQPSKQTNNKYMVSSYLTLISDQWMPHSRYSCRVTHEGNTVE
Lambda constante    (55)  PVKAGVETTTPSKQSNNKYAASSYLSLTPEQWKSHKSYSCQVTHEGSTVE
                          201       213
CAA01962 Lambda5   (201)  KSVSPAECS
Lambda constante   (105)  KTVAPTECS
```

Lambda5 compartilha apenas 62% (aminoácidos 97-209) com uma região lambda constante

Fig 8

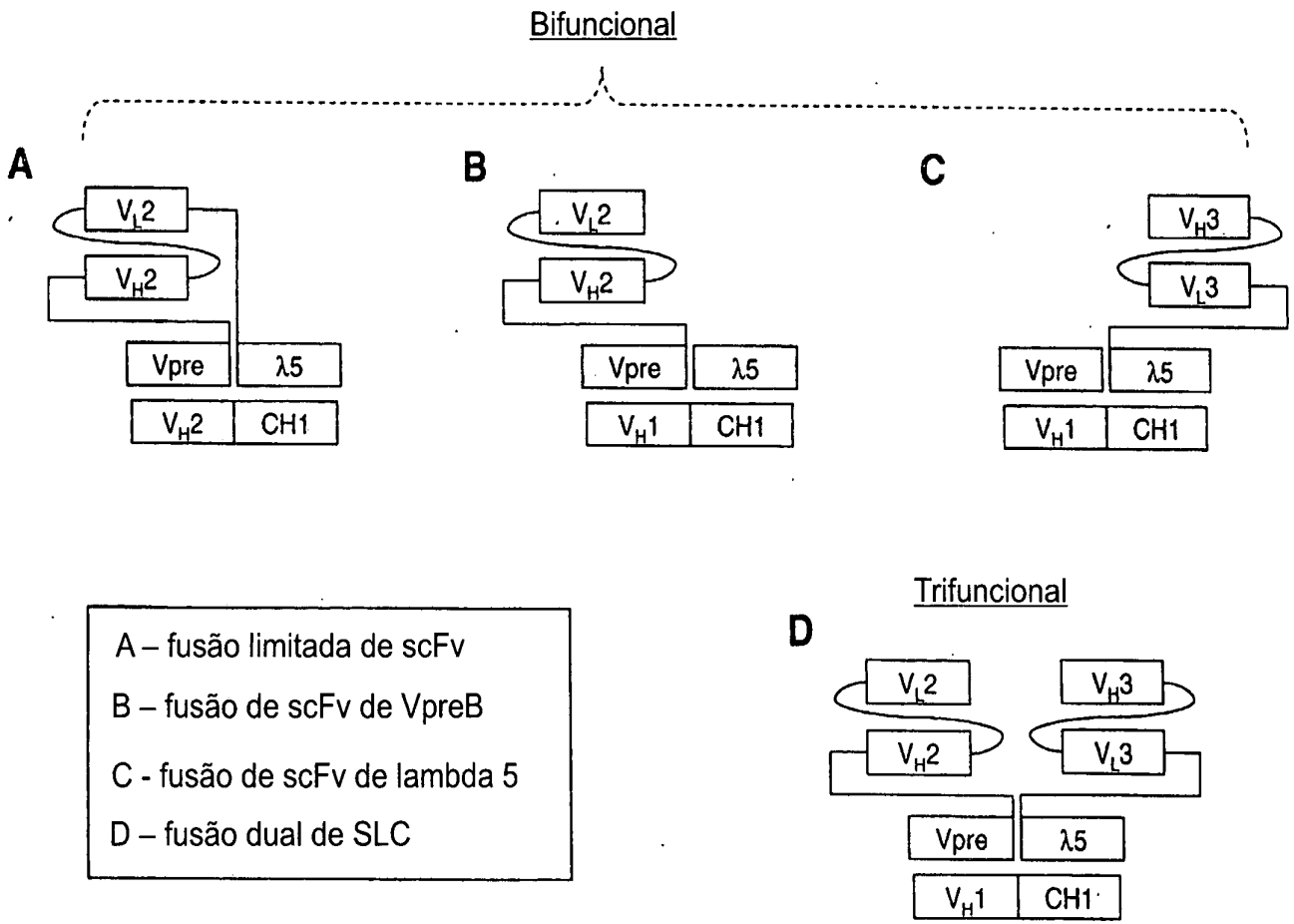
Alinhamento de SLC com Kappa Constante

```
                          1                                                  50
CAA01962 Lambda5     (1)  MKLRVGQTLGTIPRQCEVLLLLLLLGLVDGVHHILSPSSAERSRAVGPGA
Kappa constante      (1)  --------------------------------------------------
                          51                                                100
CAA01962 Lambda5    (51)  SVGSNRPSLWALPGRLLFQIIPRGAGPRCSPHRLPSKPQFWYVFGGGTQL
Kappa constante      (1)  --------------------------------------------------
                          101                                               150
CAA01962 Lambda5   (101)  TILGQPKSDPLVTLFLPSLKNLQPTRPHVVCLVSEFYPGTLVVDWKVDGV
Kappa constante      (1)  ----RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNA
                          151                                               200
CAA01962 Lambda5   (151)  PVTQG-VETTQPSKQTNNKYMVSSYLTLISDQWMPHSRYSCRVTHEGN--
Kappa constante     (47)  LQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEJHKVYACEVTHQGKSS
                          201         215
CAA01962 Lambda5   (198)  TVEKSVSPAEC
Kappa constante     (97)  PVTKSFNRGEC
```

Lambda5 compartilha apenas 35% (aminoácidos 105-209) com uma região kappa constante

Fig 9

Adição de funcionalidade aos componentes de SLC



A – fusão limitada de scFv

B – fusão de scFv de VpreB

C - fusão de scFv de lambda 5

D – fusão dual de SLC

FIG 10

MSWAPVLLMLFVYCTGCGPQPVLHQPPAMSSALGTTIRLTCTLRNDHDIG
MSWAPVLLML FVYCTGCGPQ PVLHQPPAMS SALGTTIRLT CTLRNDHDIG
VYSVYWYQQR PGHPPRFLLR YFSQSDKSQG PQVPPRFSGS KDVARNRGYL
SISELQPEDE AMYYCAMGAR SSEKEERERE WEEEMEPTAA RTRVP (VpreB1 humana ; CAG30495; 145 aminoácidos ; SEQ ID NO: 1)

MAWTSVLLML LAHLTGCGPQ PMVHQPPSAS SSLGATIRLS CTLSNDHNIG
IYSIYWYQQR PGHPPRFLLR YFSHSDKHQG PDIPPRFSGS KDTARNLGYL
SISELQPEDE AVYYCAVGLR SHEKKRMERE WEGEKSYTDL GS (VpreB2 de camundongo; P13373; 142 aminoácidos ; SEQ ID NO: 2)

MAWTSVLLML LAHLTGKGTL GVQGFLAPPV ALLCPSDGHA SIFSGCGPQP
MVHQPPSASS SLGATIRLSC TLSNDHNIGI YSIYWYQQRP GHPPRFLLRY
FSHSDKHQGP DIPPRFSGSK DTARNLGYLS ISELQPEDEA VYYCAVGLRS
HEKKRMEREW EGEKSYTDLG S (Variação de processamento da VpreB2 de camundongo ; CAA01964; 171 aminoácidos ; SEQ ID NO: 3)

MACRCLSFLL MGTFLSVSQT VLAQLDALLV FPGQVAQLSC TLSPQHVTIR
DYGVSWYQQR AGSAPRYLLY YRSEEDHHRP ADIPDRFSAA KDEAHNACVL
TISPVQPEDD ADYYCSVGYG FSP (VpreB3 humana ; CAG30496; 123 aminoácidos ;; SEQ ID NO: 4)

MKLRVGQTLGTIPRQCEVLLLLLLLGLVDGVHHILSPSSAERSRAVGPGASVGSNRPSL
WALPGRLLFQIIPRGAGPRCSPHRLPSKPQFWYVFGGGTQLTILGQPKSDPLVTLFLPSLK
NLQPTRPHVVCLVSEFYPGTLVVDWKVDGVPVTQGVETTQPSKQTNNKYMVSSYLTLI
SDQWMPHSRYSCRVTHEGNTVEKSVSPAECS (Lambda 5 humana; CAA01962; 209 aminoácidos ; SEQ ID NO: 5)

MRPGTGQGGL EAPGEPGPNL RQRWPLLLLG LAVVTHGLLR PTAASQSRAL
GPGAPGGSSR SSLRSRWGRF LLQRGSWTGP RCWPRGFQSK HNSVTHVFGS
GTQLTVLSQP KATPSVTLFP PSSEELQANK ATLVCLMNDF YPGILTVTWK
ADGTPITQGV EMTTPSKQSN NKYAASSYLS LTPEQWRSRR SYSCQVMHEG
STVEKTVAPA ECS (Proteína similar à lambda 5 humana; NP_064455; 213 aminoácidos ; SEQ ID NO 6)

FIG 10 (Cont)

Lambda5dT
MRPGTGQGGLEAPGEPGPNLRQRWPLLLLGLAVVTHGSVTHVFGSGTQLTVLSQPKAT
PSVTLFPPSSEELQANKATLVCLMNDFYPGILTVTWKADGTPITQGVEMTTPSKQSNNK
YAASSYLSLTPEQWRSRRSYSCQVMHEGSTVEKTVAPAECS (SEQ ID NO: 7)

VpreB1d
MSWAPVLLMLFVYCTGCGPQPVLHQPPAMSSALGTTIRLTCTLRNDHDIGVYSVYWYQ
QRPGHPPRFLLRYFSQSDKSQGPQVPPRFSGSKDVARNRGYLSISELQPEDEAMYYCAM
GA (SEQ ID NO: 8)

B11 HC-His+ (cadeia pesada antiinfluenza neutralizadora)
METDTLLLWVLLLWVPGSTGDAQMQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGYSFDSGYYWG
WLRQPPGKGLEWIGSIYHSRNTYYNPSLKSRVTISVDTSKNQFSLQLSSVTAADTAVYY
CARGTWYSSNLRYWFDPWGKGTLVRVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVK
DYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPS
NTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVS
HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKV
SNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWES
NGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSL
SLSPGHHHHHH (SEQ ID NO: 9)

VpreB1-Lambda5 (Fusão 1)
MSWAPVLLMLFVYCTGCGPQPVLHQPPAMSSALGTTIRLTCTLRNDHDIGVYSVYWYQ
QRPGHPPRFLLRYFSQSDKSQGPQVPPRFSGSKDVARNRGYLSISELQPEDEAMYYCAM
GARSSVTHVFGSGTQLTVLSQPKATPSVTLFPPSSEELQANKATLVCLMNDFYPGILTVT
WKADGTPITQGVEMTTPSKQSNNKYAASSYLSLTPEQWRSRRSYSCQVMHEGSTVEKT
VAPAECS (SEQ ID NO: 10)

VpreB1- CL (Fusão 2)
MSWAPVLLMLFVYCTGCGPQPVLHQPPAMSSALGTTIRLTCTLRNDHDIGVYSVYWYQ
QRPGHPPRFLLRYFSQSDKSQGPQVPPRFSGSKDVARNRGYLSISELQPEDEAMYYCAM
GARSSVTHVFGSGTQLTVLGQPKAAPSVTLFPPSSXELQANKATLVCLISDFYPGAVTVA
WKADSSPVKAGVETTTPSKQSNNKYAASSYLSLTPEQWKSHRSYSCQVTHEGSTVEKT
VAPAECS (SEQ ID NO: 11)

Fusão de gene III VpreB1-Lambda5-E tag (Fusão 1)
VKKLLLFAIPLVVPFYSHSAQPVLHQPPAMSSALGTTIRLTCTLRNDHDIGVYSVYWYQ
QRPGHPPRFLLRYFSQSDKSQGPQVPPRFSGSKDVARNRGYLSISELQPEDEAMYYCAM
GARSSVTHVFGSGTQLTVLSQPKATPSVTLFPPSSEELQANKATLVCLMNDFYPGILTVT
WKADGTPITQGVEMTTPSKQSNNKYAASSYLSLTPEQWRSRRSYSCQVMHEGSTVEKT
VAPAECSGAPVPYPDPLEPR (SEQ ID NO: 12)

Fusão de gene III VpreB1-Cl-E tag (Fusão 2)
VKKLLLFAIPLVVPFYSHSAQPVLHQPPAMSSALGTTIRLTCTLRNDHDIGVYSVYWYQ
QRPGHPPRFLLRYFSQSDKSQGPQVPPRFSGSKDVARNRGYLSISELQPEDEAMYYCAM

FIG 10 (Cont)

GARSSVTHVFGSGTQLTVLRQPKAAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVA
WKADGSPVKAGVETTTPSKQSNNKYAASSYLSLTPEQWKSHKSYSCQVTHEGSTVEKT
VAPTECSGAPVPYPDPLEPR (SEQ ID NO: 13)

(cadeia pesada antiinfluenza não neutralizadora)

MKYLLPTAAAGLLLLAAQPAMAQVQLQESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFPFSSYVMIW
VRQVPGKGLEWVSAIGGSGGSTYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRADDTAVY
YCVLSPKSYYDNSGIYFDFWGKGTLVRVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLV
KDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKP
SNTKVDKRVEPKSCAAAHHHHHHGEQKLISEEDL (SEQ ID NO: 14)

(cadeia pesada de IgM antiinfluenza não neutralizadora)

MKYLLPTAAAGLLLLAAQPAMAQVQLQESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFPFSSYVMIW
VRQVPGKGLEWVSAIGGSGGSTYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRADDTAVY
YCVLSPKSYYDNSGIYFDFWGKGTLVRVSSGSASAPTLFPLVSCENSPSDTSSVAVGCLA
QDFLPDSITFSWKYKNNSDISSTRGFPSVLRGGKYAATSQVLLPSKDVMQGTDEHVVCK
VQHPNGNKEKNVPLPVAAAHHHHHHGEQKLISEEDL (SEQ ID NO: 15)

GAPVPYPDPLEPR (SEQ ID NO: 16)

GEQKLISLEEDL (SEQ ID NO: 17)

gene III líder VpreB1-E tag de comprimento completo

VKKLLLFAIPLVVPFYSHSAQPVLHQPPAMSSALGTTIRLTCTLRNDHDIGVYSVYWYQ
QRPGHPPRFLLRYFSQSDKSQGPQVPPRFSGSKDVARNRGYLSISELQPEDEAMYYCAM
GARSSEKEEREREWEEEMEPTAARTRVPGAPVPYPDPLEPR (SEQ ID NO: 18)

gene III líder VpreB1dT

VKKLLLFAIPLVVPFYSHSAQPVLHQPPAMSSALGTTIRLTCTLRNDHDIGVYSVYWYQ
QRPGHPPRFLLRYFSQSDKSQGPQVPPRFSGSKDVARNRGYLSISELQPEDEAMYYCAM
GA (SEQ ID NO: 19)

gene III líder VprB1dT-E tag

VKKLLLFAIPLVVPFYSHSAQPVLHQPPAMSSALGTTIRLTCTLRNDHDIGVYSVYWYQ
QRPGHPPRFLLRYFSQSDKSQGPQVPPRFSGSKDVARNRGYLSISELQPEDEAMYYCAM
GAGAPVPYPDPLEPR (SEQ ID NO: 20)

OmpA líder-Lambda5

MKKTAIAIAVALAGFATVAQAALLRPTAASQSRALGPGAPGGSSRSSLRSRWGRFLLQR
GSWTGPRCWPRGFQSKHNSVTHVFGSGTQLTVLSQPKATPSVTLFPPSSEELQANKATL
VCLMNDFYPGILTVTWKADGTPITQGVEMTTPSKQSNNKYAASSYLSLTPEQWRSRRSY
SCQVMHEGSTVEKTVAPAECS (SEQ ID NO: 21)

FIG 10 (Cont)

OmpA líder-Lambda5dT

MKKTAIAIAVALAGFATVAQAASVTHVFGSGTQLTVLSQPKATPSVTLFPPSSEELQAN
KATLVCLMNDFYPGILTVTWKADGTPITQGVEMTTPSKQSNNKYAASSYLSLTPEQWR
SRRSYSCQVMHEGSTVEKTVAPAECS (SEQ ID NO: 22)

GLP-1 VpreB1 de comprimento completo

MSWAPVLLMLFVYCTGCGPQPVLHQPPAMSSALGTTIRLTCTLRNDHDIGVYSVYWYQ
QRPGHPPRFLLRYFSQSDKSQGPQVPPRFSGSKDVARNRGYLSISELQPEDEAMYYCAM
GARSSEKEEREREWEEEMEPTAARTRVPHAEGTFTSDVSSYLEGQAAKEFIAWLVKGR
(SEQ ID NO: 23)

GLP-1 VpreB1dT

MSWAPVLLMLFVYCTGCGPQPVLHQPPAMSSALGTTIRLTCTLRNDHDIGVYSVYWYQ
QRPGHPPRFLLRYFSQSDKSQGPQVPPRFSGSKDVARNRGYLSISELQPEDEAMYYCAM
GAHAEGTFTSDVSSYLEGQAAKEFIAWLVKGR (SEQ ID NO: 24)

GLP-1 Lambda5 de comprimento completo

MRPGTGQGGLEAPGEPGPNLRQRWPLLLLHAEGTFTSDVSSYLEGQAAKEFIAWLVKG
RGLAVVTHGLLRPTAASQSRALGPGAPGGSSRSSLRSRWGRFLLQRGSWTGPRCWPRG
FQSKHNSVTHVFGSGTQLTVLSQPKATPSVTLFPPSSEELQANKATLVCLMNDFYPGILT
VTWKADGTPITQGVEMTTPSKQSNNKYAASSYLSLTPEQWRSRRSYSCQVMHEGSTVE
KTVAPAECS (SEQ ID NO: 25)

GLP-1 Lambda5dT

MRPGTGQGGLEAPGEPGPNLRQRWPLLLLGHAEGTFTSDVSSYLEGQAAKEFIAWLVK
GRLAVVTHGSVTHVFGSGTQLTVLSQPKATPSVTLFPPSSEELQANKATLVCLMNDFYP
GILTVTWKADGTPITQGVEMTTPSKQSNNKYAASSYLSLTPEQWRSRRSYSCQVMHEGS
TVEKTVAPAECS (SEQ ID NO: 26)

Fig 11

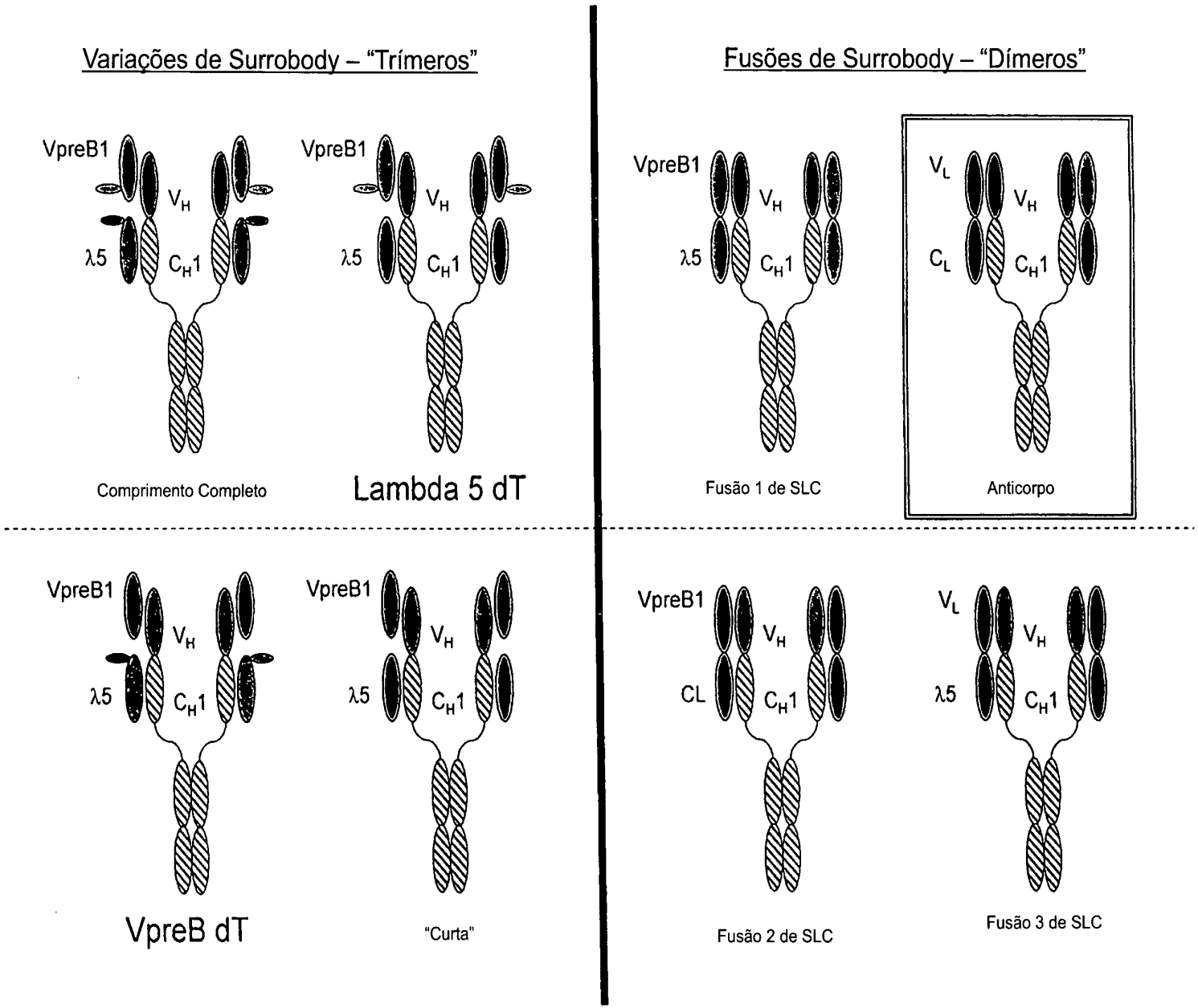
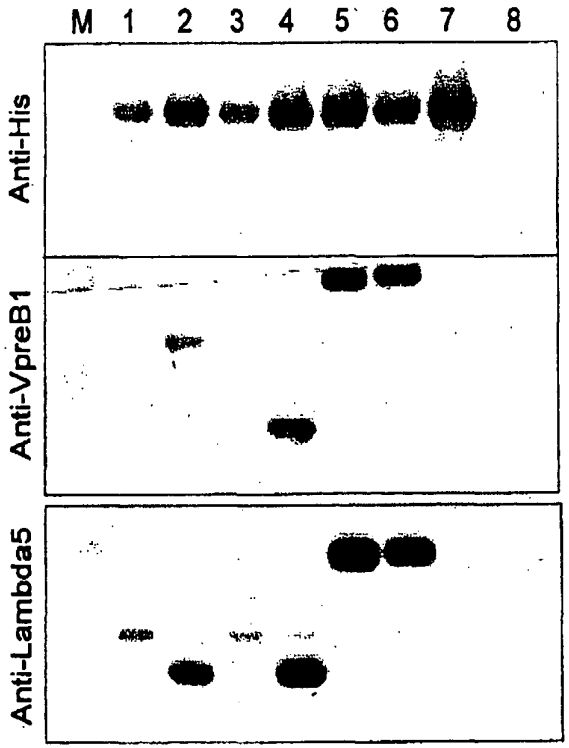

Variações de Surrobody – "Trímeros"
Fusões de Surrobody – "Dímeros"
VpreB1
V_H
λ5
C_H1
Comprimento Completo
Lambda 5 dT
VpreB dT
"Curta"
V_L
C_L
CL
Fusão 1 de SLC
Anticorpo
Fusão 2 de SLC
Fusão 3 de SLC

Fig 12

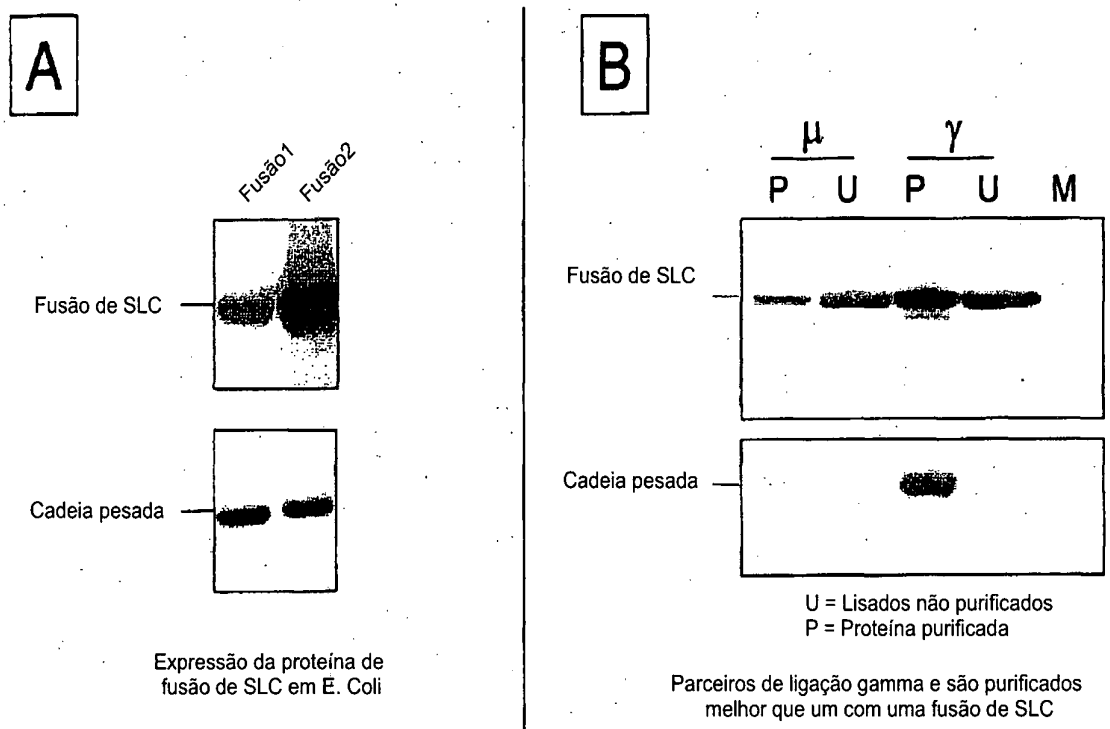
Detecção de Cadeias leves substitutas e cadeias pesadas complexadas



M Marcador
1 Surrobody de comprimento completo
2 Surrobody de Lambda 5 dT
3 Surrobody de VpreB dT
4 Surrobody Curto
5 Fusão 1 de Surrobody
6 Fusão 2 de Surrobody
7 anticorpo

Fig 13

Proteínas de fusão de SLC são bem expressas e secretadas dentro do periplasma de E. coli e são melhores parceiras de ligação com cadeia pesada CH1 de IgG1 ao invés de IgM

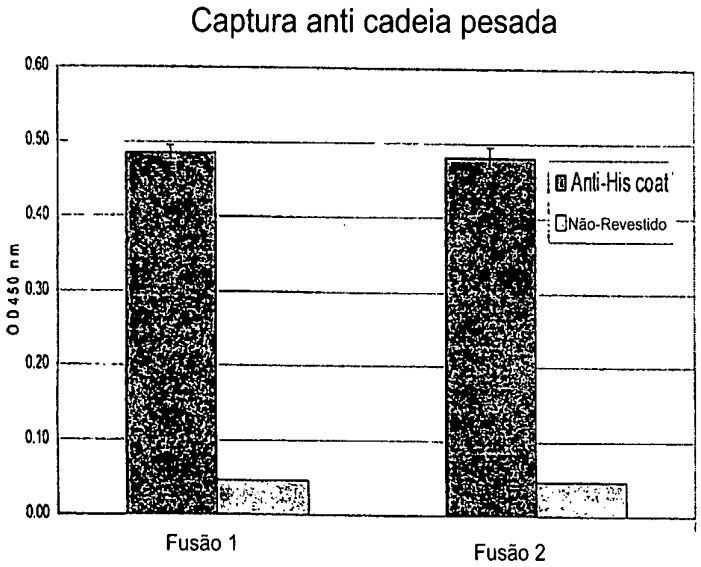


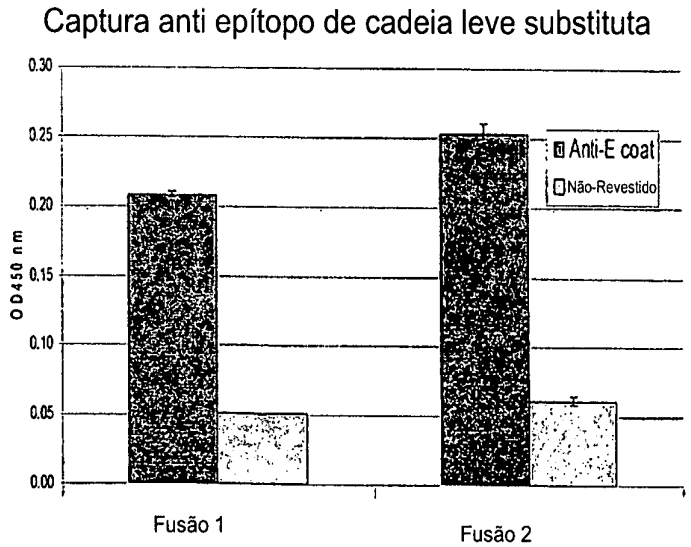
Expressão da proteína de fusão de SLC em E. Coli

Parceiros de ligação gamma e são purificados melhor que um com uma fusão de SLC

Fig 14

ELISA de captura de surrobody em fagos através da detecção antifago





Fago expressando qualquer uma das fusões de cadeia leve substituta é imobilizado através de complexos estáveis com fragmentos de cadeia pesada fundidos com o gene III de m13

Fig 15

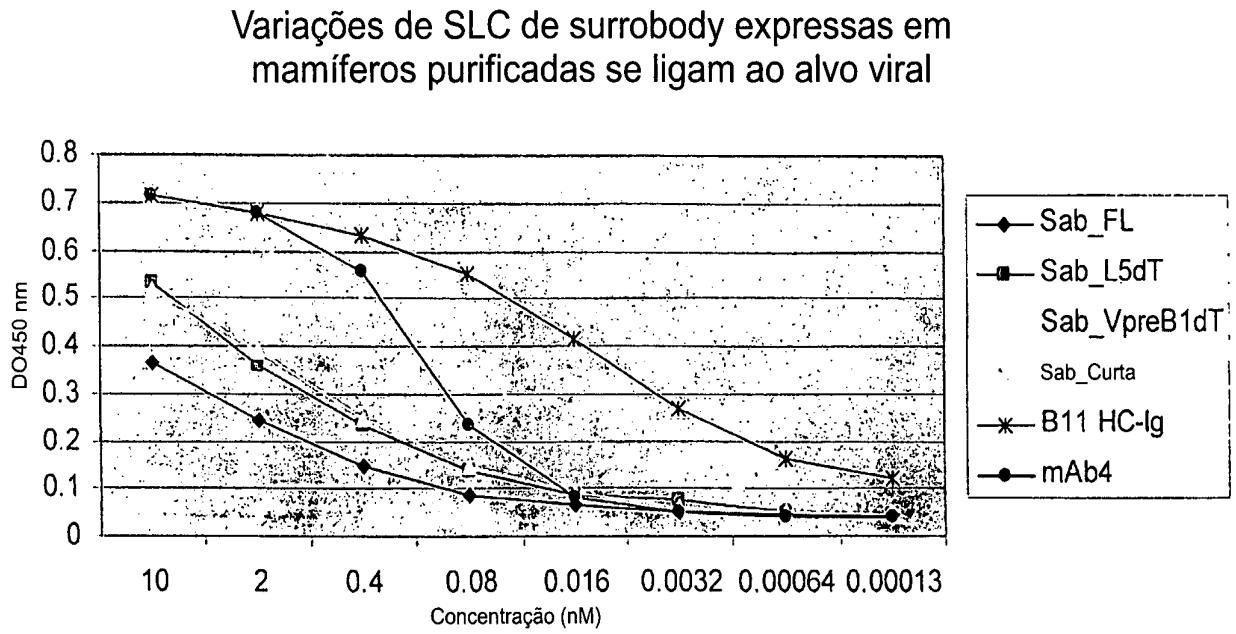
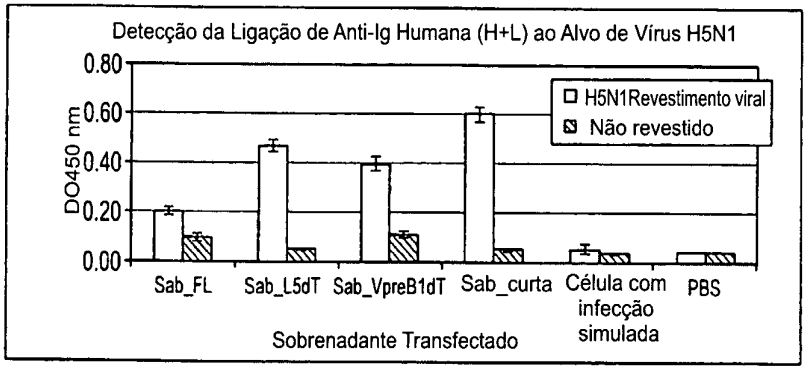

Variações de SLC de surrobody expressas em mamíferos purificadas se ligam ao alvo viral
DO450 nm
0.8
0.7
0.6
0.5
0.4
0.3
0.2
0.1
0
10
2
0.4
0.08
0.016
0.0032
0.00064
0.00013
Concentração (nM)
Sab_FL
Sab_L5dT
Sab_VpreB1dT
Sab_Curta
B11 HC-Ig
mAb4

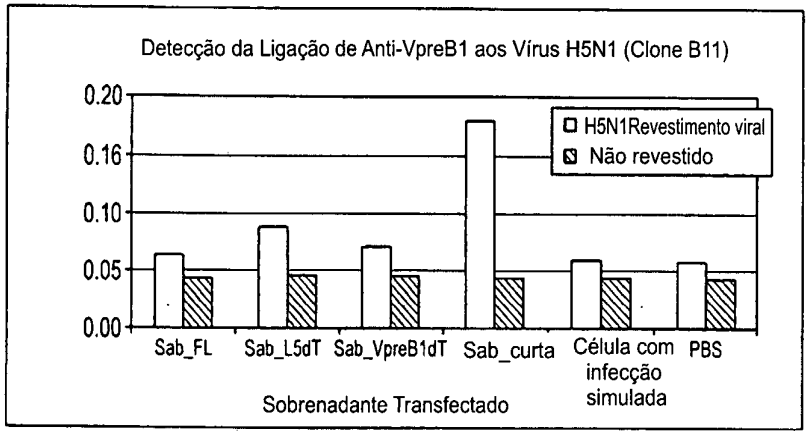
Fig 16

Sobrenadantes de Variações de SLC de Surrobody Expressas em Mamíferos Contêm Complexos Estáveis que se Ligam ao Alvo Viral



Ligação ao antígeno em trímero

Detecção de cadeia pesada



Detecção de VpreB1

Fig 17

Ligação ao Antígeno com Lisados Periplasmáticos de E. coli

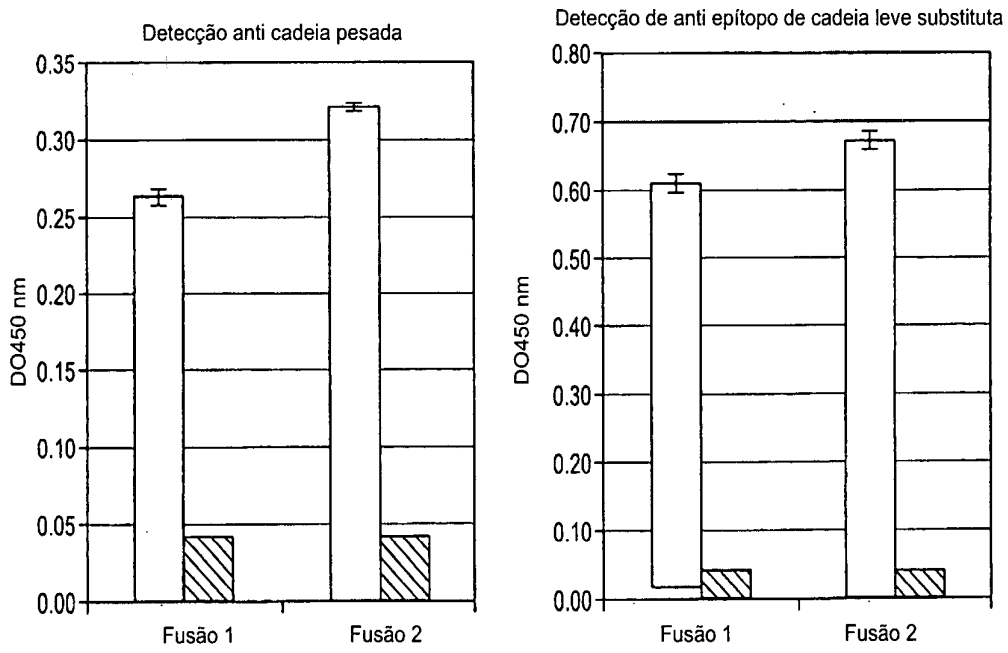


Fig 18

Fago com Fusão de SLC de Surrobody Pareado com Cadeia Pesada Neutralizadora se Liga Rapidamente ao Antígeno HA de H5

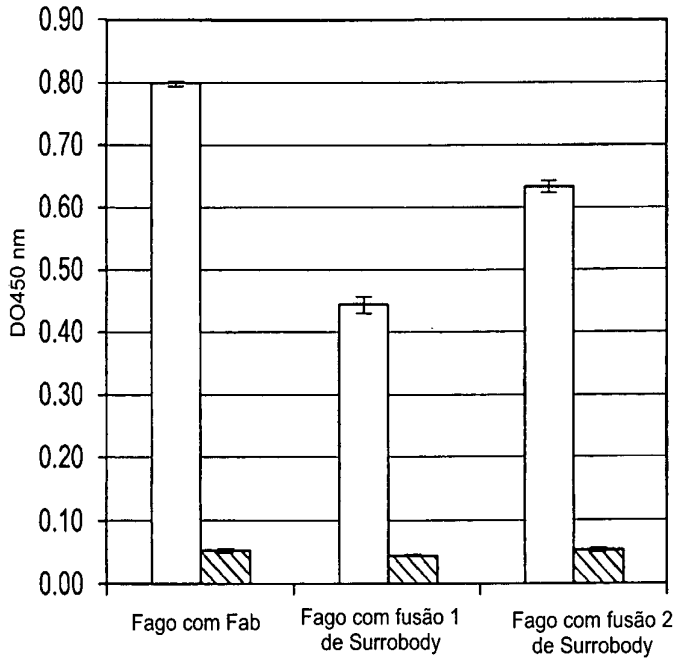


Fig 19

Fago com variação de Surrobody pareado com cadeia pesada neutralizadora se liga ao antígeno

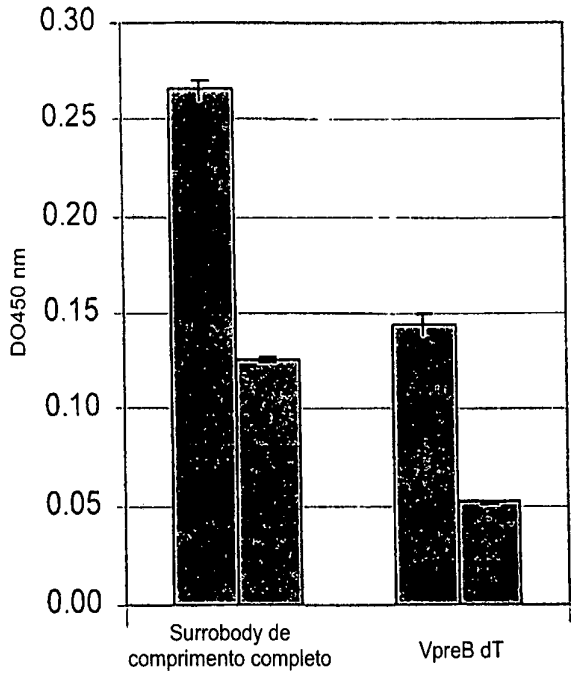
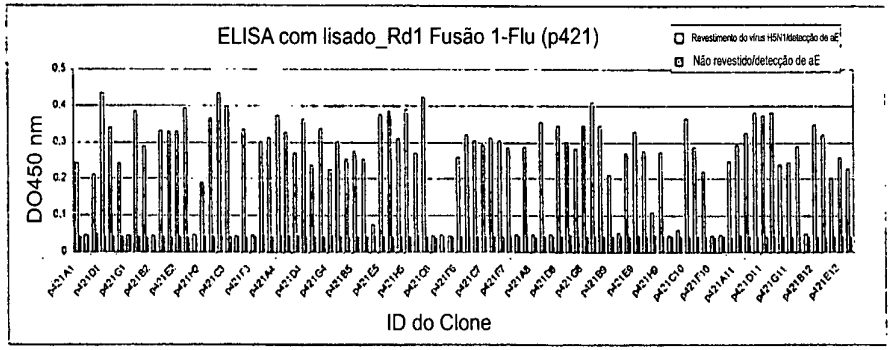


Fig 20

Número de transformantes	Biblioteca	Ciclo de peneiração (aumento de vezes)	Porcentagem de clones positivos
3.84×10^7	Fusão 1 - Influenza	1 (5x)	79%
	Fusão 2 – Influenza	2 (97x)	95%
7.80×10^7	Fusão 1 - Influenza	1 (20x)	95%
	Fusão 2 – Influenza	2 (48x)	99%

Fig 21

Análise clonal de clones da biblioteca de Fusão 1 do Ciclo 1



Análise clonal de clones da biblioteca de Fusão 2 do Ciclo 1

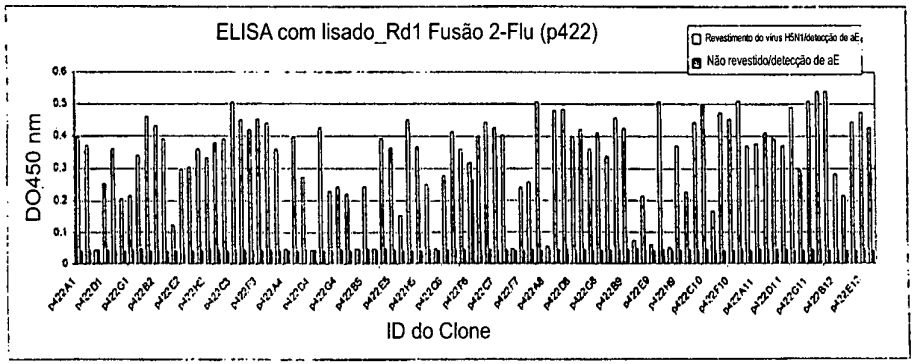
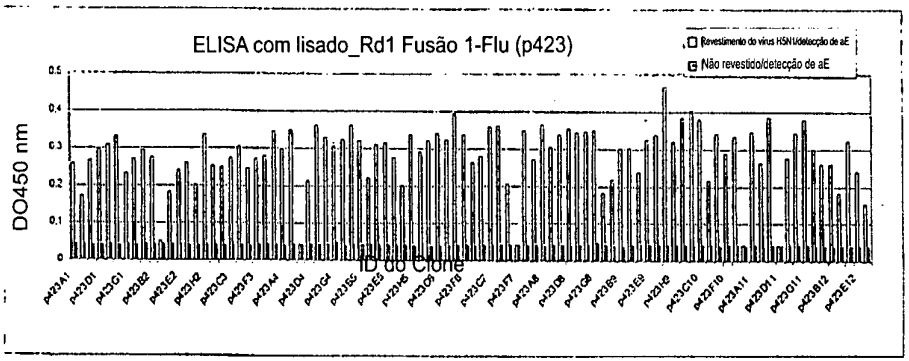
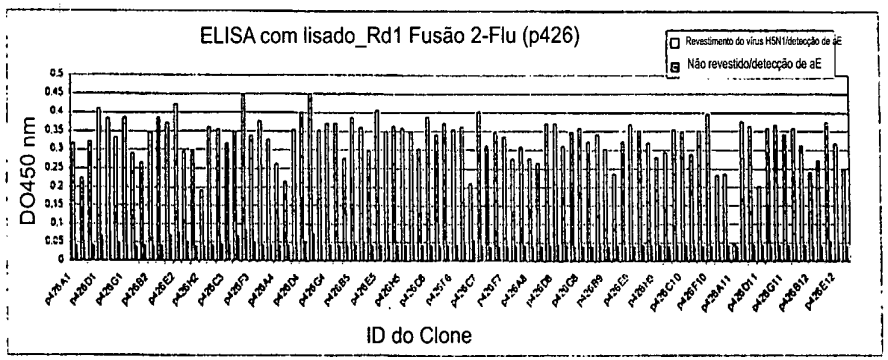


Fig 22

Análise clonal de clones da biblioteca de Fusão 1 do Ciclo 2



Análise clonal de clones da biblioteca de Fusão 1 e de Fusão 2 do Ciclo 2



RESUMO

Patente de Invenção: **"CONSTRUCTOS E BIBLIOTECAS QUE COMPREENDEM SEQUÊNCIAS DE CADEIA LEVE SUBSTITUTA DE ANTICORPOS".**

A presente invenção refere-se a constructos e bibliotecas que compreendem sequências de cadeia leve substituta de anticorpos. Em particular, a invenção está refere-se o constructos que compreendem sequências de VpreB, opcionalmente como parceiras de ligação com outro polipeptídeo, tal como, por exemplo, sequências de domínios variáveis de cadeias pesadas de anticorpos e bibliotecas que contêm as mesmas.

LISTAGEM DE SEQUÊNCIA

<110> SEA LANE BIOTECHNOLOGIES, LLC

<120> CONSTRUCTOS E BIBLIOTECAS QUE COMPREENDEM SEQUÊNCIAS DE CADEIA LEVE SUBSTITUTA DE ANTICORPOS

<130> SLN-0009 PCT

<140> PCT/US2008/058283

<141> 2008-04-17

<150> 60/920,568

<151> 2007-03-27

<160> 35

<170> PatentIn Vide. 3.3

<210> 1

<211> 145

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 1

Met Ser Trp Ala Pro Val Leu Leu Met Leu Phe Val Tyr Cys Thr Gly
1 5 10 15

Cys Gly Pro Gln Pro Val Leu His Gln Pro Pro Ala Met Ser Ser Ala
20 25 30

Leu Gly Thr Thr Ile Arg Leu Thr Cys Thr Leu Arg Asn Asp His Asp
35 40 45

Ile Gly Val Tyr Ser Val Tyr Trp Tyr Gln Gln Arg Pro Gly His Pro
50 55 60

Pro Arg Phe Leu Leu Arg Tyr Phe Ser Gln Ser Asp Lys Ser Gln Gly
65 70 75 80

Pro Gln Val Pro Pro Arg Phe Ser Gly Ser Lys Asp Val Ala Arg Asn
85 90 95

Arg Gly Tyr Leu Ser Ile Ser Glu Leu Gln Pro Glu Asp Glu Ala Met
100 105 110

Tyr Tyr Cys Ala Met Gly Ala Arg Ser Ser Glu Lys Glu Glu Arg Glu

115 120 125

Arg Glu Trp Glu Glu Glu Met Glu Pro Thr Ala Ala Arg Thr Arg Val

130 135 140

Pro

145

<210> 2

<211> 142

<212> PRT

<213> Mus sp.

<400> 2

Met Ala Trp Thr Ser Val Leu Leu Met Leu Leu Ala His Leu Thr Gly

1 5 10 15

Cys Gly Pro Gln Pro Met Val His Gln Pro Pro Ser Ala Ser Ser Ser

20 25 30

Leu Gly Ala Thr Ile Arg Leu Ser Cys Thr Leu Ser Asn Asp His Asn

35 40 45

Ile Gly Ile Tyr Ser Ile Tyr Trp Tyr Gln Gln Arg Pro Gly His Pro

50 55 60

Pro Arg Phe Leu Leu Arg Tyr Phe Ser His Ser Asp Lys His Gln Gly

65 70 75 80

Pro Asp Ile Pro Pro Arg Phe Ser Gly Ser Lys Asp Thr Ala Arg Asn

85 90 95

Leu Gly Tyr Leu Ser Ile Ser Glu Leu Gln Pro Glu Asp Glu Ala Val

100 105 110

Tyr Tyr Cys Ala Val Gly Leu Arg Ser His Glu Lys Lys Arg Met Glu

115 120 125

Arg Glu Trp Glu Gly Glu Lys Ser Tyr Thr Asp Leu Gly Ser

130 135 140

<210> 3

<211> 171

<212> PRT

<213> Mus sp.

<400> 3

Met Ala Trp Thr Ser Val Leu Leu Met Leu Leu Ala His Leu Thr Gly
1 5 10 15

Lys Gly Thr Leu Gly Val Gln Gly Phe Leu Ala Pro Pro Val Ala Leu
20 25 30

Leu Cys Pro Ser Asp Gly His Ala Ser Ile Phe Ser Gly Cys Gly Pro
35 40 45

Gln Pro Met Val His Gln Pro Pro Ser Ala Ser Ser Ser Leu Gly Ala
50 55 60

Thr Ile Arg Leu Ser Cys Thr Leu Ser Asn Asp His Asn Ile Gly Ile
65 70 75 80

Tyr Ser Ile Tyr Trp Tyr Gln Gln Arg Pro Gly His Pro Pro Arg Phe
85 90 95

Leu Leu Arg Tyr Phe Ser His Ser Asp Lys His Gln Gly Pro Asp Ile
100 105 110

Pro Pro Arg Phe Ser Gly Ser Lys Asp Thr Ala Arg Asn Leu Gly Tyr
115 120 125

Leu Ser Ile Ser Glu Leu Gln Pro Glu Asp Glu Ala Val Tyr Tyr Cys
130 135 140

Ala Val Gly Leu Arg Ser His Glu Lys Lys Arg Met Glu Arg Glu Trp
145 150 155 160

Glu Gly Glu Lys Ser Tyr Thr Asp Leu Gly Ser
165 170

<210> 4

<211> 123

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 4

Met Ala Cys Arg Cys Leu Ser Phe Leu Leu Met Gly Thr Phe Leu Ser
1 5 10 15

Val Ser Gln Thr Val Leu Ala Gln Leu Asp Ala Leu Leu Val Phe Pro
20 25 30

Gly Gln Val Ala Gln Leu Ser Cys Thr Leu Ser Pro Gln His Val Thr
35 40 45
Ile Arg Asp Tyr Gly Val Ser Trp Tyr Gln Gln Arg Ala Gly Ser Ala
50 55 60
Pro Arg Tyr Leu Leu Tyr Tyr Arg Ser Glu Glu Asp His His Arg Pro
65 70 75 80
Ala Asp Ile Pro Asp Arg Phe Ser Ala Ala Lys Asp Glu Ala His Asn
85 90 95
Ala Cys Val Leu Thr Ile Ser Pro Val Gln Pro Glu Asp Asp Ala Asp
100 105 110
Tyr Tyr Cys Ser Val Gly Tyr Gly Phe Ser Pro
115 120

<210> 5
<211> 209
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 5

Met Lys Leu Arg Val Gly Gln Thr Leu Gly Thr Ile Pro Arg Gln Cys
1 5 10 15
Glu Val Leu Leu Leu Leu Leu Leu Leu Gly Leu Val Asp Gly Val His
20 25 30
His Ile Leu Ser Pro Ser Ser Ala Glu Arg Ser Arg Ala Val Gly Pro
35 40 45
Gly Ala Ser Val Gly Ser Asn Arg Pro Ser Leu Trp Ala Leu Pro Gly
50 55 60
Arg Leu Leu Phe Gln Ile Ile Pro Arg Gly Ala Gly Pro Arg Cys Ser
65 70 75 80
Pro His Arg Leu Pro Ser Lys Pro Gln Phe Trp Tyr Val Phe Gly Gly
85 90 95
Gly Thr Gln Leu Thr Ile Leu Gly Gln Pro Lys Ser Asp Pro Leu Val
100 105 110
Thr Leu Phe Leu Pro Ser Leu Lys Asn Leu Gln Pro Thr Arg Pro His

115 120 125
Val Val Cys Leu Val Ser Glu Phe Tyr Pro Gly Thr Leu Val Val Asp
130 135 140
Trp Lys Val Asp Gly Val Pro Val Thr Gln Gly Val Glu Thr Thr Gln
145 150 155 160
Pro Ser Lys Gln Thr Asn Asn Lys Tyr Met Val Ser Ser Tyr Leu Thr
165 170 175
Leu Ile Ser Asp Gln Trp Met Pro His Ser Arg Tyr Ser Cys Arg Val
180 185 190
Thr His Glu Gly Asn Thr Val Glu Lys Ser Val Ser Pro Ala Glu Cys
195 200 205
Ser

<210> 6
<211> 213
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 6
Met Arg Pro Gly Thr Gly Gln Gly Gly Leu Glu Ala Pro Gly Glu Pro
1 5 10 15
Gly Pro Asn Leu Arg Gln Arg Trp Pro Leu Leu Leu Leu Gly Leu Ala
20 25 30
Val Val Thr His Gly Leu Leu Arg Pro Thr Ala Ala Ser Gln Ser Arg
35 40 45
Ala Leu Gly Pro Gly Ala Pro Gly Gly Ser Ser Arg Ser Ser Leu Arg
50 55 60
Ser Arg Trp Gly Arg Phe Leu Leu Gln Arg Gly Ser Trp Thr Gly Pro
65 70 75 80
Arg Cys Trp Pro Arg Gly Phe Gln Ser Lys His Asn Ser Val Thr His
85 90 95
Val Phe Gly Ser Gly Thr Gln Leu Thr Val Leu Ser Gln Pro Lys Ala
100 105 110

Thr Pro Ser Val Thr Leu Phe Pro Pro Ser Ser Glu Glu Leu Gln Ala
115 120 125
Asn Lys Ala Thr Leu Val Cys Leu Met Asn Asp Phe Tyr Pro Gly Ile
130 135 140
Leu Thr Val Thr Trp Lys Ala Asp Gly Thr Pro Ile Thr Gln Gly Val
145 150 155 160
Glu Met Thr Thr Pro Ser Lys Gln Ser Asn Asn Lys Tyr Ala Ala Ser
165 170 175
Ser Tyr Leu Ser Leu Thr Pro Glu Gln Trp Arg Ser Arg Arg Ser Tyr
180 185 190
Ser Cys Gln Val Met His Glu Gly Ser Thr Val Glu Lys Thr Val Ala
195 200 205
Pro Ala Glu Cys Ser
210
<210> 7
<211> 158
<212> PRT
<213> Sequência artificial
<220>
<221> Fonte
<223> observação="Descrição de Sequencia artificial: Constructo sintético"
<400> 7
Met Arg Pro Gly Thr Gly Gln Gly Gly Leu Glu Ala Pro Gly Glu Pro
1 5 10 15
Gly Pro Asn Leu Arg Gln Arg Trp Pro Leu Leu Leu Leu Gly Leu Ala
20 25 30
Val Val Thr His Gly Ser Val Thr His Val Phe Gly Ser Gly Thr Gln
35 40 45
Leu Thr Val Leu Ser Gln Pro Lys Ala Thr Pro Ser Val Thr Leu Phe
50 55 60
Pro Pro Ser Ser Glu Glu Leu Gln Ala Asn Lys Ala Thr Leu Val Cys

65 70 75 80
Leu Met Asn Asp Phe Tyr Pro Gly Ile Leu Thr Val Thr Trp Lys Ala
85 90 95
Asp Gly Thr Pro Ile Thr Gln Gly Val Glu Met Thr Thr Pro Ser Lys
100 105 110
Gln Ser Asn Asn Lys Tyr Ala Ala Ser Ser Tyr Leu Ser Leu Thr Pro
115 120 125
Glu Gln Trp Arg Ser Arg Arg Ser Tyr Ser Cys Gln Val Met His Glu
130 135 140
Gly Ser Thr Val Glu Lys Thr Val Ala Pro Ala Glu Cys Ser
145 150 155
<210> 8
<211> 119
<212> PRT
<213> Sequência artificial
<220>
<221> Fonte
<223> observação="Descrição de Sequencia artificial: constructo sintético
<400> 8
Met Ser Trp Ala Pro Val Leu Leu Met Leu Phe Val Tyr Cys Thr Gly
1 5 10 15
Cys Gly Pro Gln Pro Val Leu His Gln Pro Pro Ala Met Ser Ser Ala
20 25 30
Leu Gly Thr Thr Ile Arg Leu Thr Cys Thr Leu Arg Asn Asp His Asp
35 40 45
Ile Gly Val Tyr Ser Val Tyr Trp Tyr Gln Gln Arg Pro Gly His Pro
50 55 60
Pro Arg Phe Leu Leu Arg Tyr Phe Ser Gln Ser Asp Lys Ser Gln Gly
65 70 75 80
Pro Gln Val Pro Pro Arg Phe Ser Gly Ser Lys Asp Val Ala Arg Asn
85 90 95

Arg Gly Tyr Leu Ser Ile Ser Glu Leu Gln Pro Glu Asp Glu Ala Met
100 105 110
Tyr Tyr Cys Ala Met Gly Ala
115

<210> 9
<211> 480
<212> PRT
<213> Sequência artificial
<220>
<221> Fonte
<223> /observação="Descrição de Sequência artificial: Constructo sintético"
<400> 9

Met Glu Thr Asp Thr Leu Leu Leu Trp Val Leu Leu Leu Trp Val Pro
1 5 10 15
Gly Ser Thr Gly Asp Ala Gln Met Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly
20 25 30
Leu Val Lys Pro Ser Glu Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly
35 40 45
Tyr Ser Phe Asp Ser Gly Tyr Tyr Trp Gly Trp Leu Arg Gln Pro Pro
50 55 60
Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile Gly Ser Ile Tyr His Ser Arg Asn Thr
65 70 75 80
Tyr Tyr Asn Pro Ser Leu Lys Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr
85 90 95
Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu Gln Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp
100 105 110
Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Gly Thr Trp Tyr Ser Ser Asn Leu
115 120 125
Arg Tyr Trp Phe Asp Pro Trp Gly Lys Gly Thr Leu Val Arg Val Ser
130 135 140
Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser

145 150 155 160
Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp
165 170 175
Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr
180 185 190
Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr
195 200 205
Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln
210 215 220
Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp
225 230 235 240
Lys Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro
245 250 255
Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro
260 265 270
Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr
275 280 285
Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn
290 295 300
Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg
305 310 315 320
Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val
325 330 335
Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser
340 345 350
Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys
355 360 365
Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu
370 375 380
Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe
385 390 395 400
Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu

405 410 415

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

420 425 430

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

435 440 445

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

450 455 460

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

465 470 475 480

<210> 10

<211> 242

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

<221> Fonte

<223> /observação="Descrição de Sequência artificial: Constructo sintético"

<400> 10

Met Ser Trp Ala Pro Val Leu Leu Met Leu Phe Val Tyr Cys Thr Gly

1 5 10 15

Cys Gly Pro Gln Pro Val Leu His Gln Pro Pro Ala Met Ser Ser Ala

20 25 30

Leu Gly Thr Thr Ile Arg Leu Thr Cys Thr Leu Arg Asn Asp His Asp

35 40 45

Ile Gly Val Tyr Ser Val Tyr Trp Tyr Gln Gln Arg Pro Gly His Pro

50 55 60

Pro Arg Phe Leu Leu Arg Tyr Phe Ser Gln Ser Asp Lys Ser Gln Gly

65 70 75 80

Pro Gln Val Pro Pro Arg Phe Ser Gly Ser Lys Asp Val Ala Arg Asn

85 90 95

Arg Gly Tyr Leu Ser Ile Ser Glu Leu Gln Pro Glu Asp Glu Ala Met

100 105 110

Tyr Tyr Cys Ala Met Gly Ala Arg Ser Ser Val Thr His Val Phe Gly

115 120 125

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

130 135 140

Val Thr Leu Phe Pro Pro Ser Ser Glu Glu Leu Gln Ala Asn Lys Ala

145 150 155 160

Thr Leu Val Cys Leu Met Asn Asp Phe Tyr Pro Gly Ile Leu Thr Val

165 170 175

Thr Trp Lys Ala Asp Gly Thr Pro Ile Thr Gln Gly Val Glu Met Thr

180 185 190

Thr Pro Ser Lys Gln Ser Asn Asn Lys Tyr Ala Ala Ser Ser Tyr Leu

195 200 205

Ser Leu Thr Pro Glu Gln Trp Arg Ser Arg Arg Ser Tyr Ser Cys Gln

210 215 220

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

225 230 235 240

Cys Ser

<210> 11

<211> 242

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

<221> Fonte

<223> /observação="Descrição de Sequência artificial: Constructo sintético"

<220>

<221> MOD_RES

<222> (153)..(153)

<223> Qualquer aminoácido

<400> 11

Met Ser Trp Ala Pro Val Leu Leu Met Leu Phe Val Tyr Cys Thr Gly
1 5 10 15
Cys Gly Pro Gln Pro Val Leu His Gln Pro Pro Ala Met Ser Ser Ala
20 25 30
Leu Gly Thr Thr Ile Arg Leu Thr Cys Thr Leu Arg Asn Asp His Asp
35 40 45
Ile Gly Val Tyr Ser Val Tyr Trp Tyr Gln Gln Arg Pro Gly His Pro
50 55 60
Pro Arg Phe Leu Leu Arg Tyr Phe Ser Gln Ser Asp Lys Ser Gln Gly
65 70 75 80
Pro Gln Val Pro Pro Arg Phe Ser Gly Ser Lys Asp Val Ala Arg Asn
85 90 95
Arg Gly Tyr Leu Ser Ile Ser Glu Leu Gln Pro Glu Asp Glu Ala Met
100 105 110
Tyr Tyr Cys Ala Met Gly Ala Arg Ser Ser Val Thr His Val Phe Gly
115 120 125
Ser Gly Thr Gln Leu Thr Val Leu Gly Gln Pro Lys Ala Ala Pro Ser
130 135 140
Val Thr Leu Phe Pro Pro Ser Ser Xaa Glu Leu Gln Ala Asn Lys Ala
145 150 155 160
Thr Leu Val Cys Leu Ile Ser Asp Phe Tyr Pro Gly Ala Val Thr Val
165 170 175
Ala Trp Lys Ala Asp Ser Ser Pro Val Lys Ala Gly Val Glu Thr Thr
180 185 190
Thr Pro Ser Lys Gln Ser Asn Asn Lys Tyr Ala Ala Ser Ser Tyr Leu
195 200 205
Ser Leu Thr Pro Glu Gln Trp Lys Ser His Arg Ser Tyr Ser Cys Gln
210 215 220
Val Thr His Glu Gly Ser Thr Val Glu Lys Thr Val Ala Pro Ala Glu
225 230 235 240
Cys Ser

<210> 12

<211> 256

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

<221> Fonte

<223> /observação="Descrição de Sequência artificial: Constructo sintético"

<400> 12

Val Lys Lys Leu Leu Leu Phe Ala Ile Pro Leu Val Val Pro Phe Tyr
1 5 10 15

Ser His Ser Ala Gln Pro Val Leu His Gln Pro Pro Ala Met Ser Ser
20 25 30

Ala Leu Gly Thr Thr Ile Arg Leu Thr Cys Thr Leu Arg Asn Asp His
35 40 45

Asp Ile Gly Val Tyr Ser Val Tyr Trp Tyr Gln Gln Arg Pro Gly His
50 55 60

Pro Pro Arg Phe Leu Leu Arg Tyr Phe Ser Gln Ser Asp Lys Ser Gln
65 70 75 80

Gly Pro Gln Val Pro Pro Arg Phe Ser Gly Ser Lys Asp Val Ala Arg
85 90 95

Asn Arg Gly Tyr Leu Ser Ile Ser Glu Leu Gln Pro Glu Asp Glu Ala
100 105 110

Met Tyr Tyr Cys Ala Met Gly Ala Arg Ser Ser Val Thr His Val Phe
115 120 125

Gly Ser Gly Thr Gln Leu Thr Val Leu Ser Gln Pro Lys Ala Thr Pro
130 135 140

Ser Val Thr Leu Phe Pro Pro Ser Ser Glu Glu Leu Gln Ala Asn Lys
145 150 155 160

Ala Thr Leu Val Cys Leu Met Asn Asp Phe Tyr Pro Gly Ile Leu Thr
165 170 175

Val Thr Trp Lys Ala Asp Gly Thr Pro Ile Thr Gln Gly Val Glu Met

180 185 190

Thr Thr Pro Ser Lys Gln Ser Asn Asn Lys Tyr Ala Ala Ser Ser Tyr

195 200 205

Leu Ser Leu Thr Pro Glu Gln Trp Arg Ser Arg Arg Ser Tyr Ser Cys

210 215 220

Gln Val Met His Glu Gly Ser Thr Val Glu Lys Thr Val Ala Pro Ala

225 230 235 240

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

245 250 255

<210> 13

<211> 256

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

<221> Fonte

<223> /observação="Descrição de Sequência artificial: Constructo sintético"

<400> 13

Val Lys Lys Leu Leu Leu Phe Ala Ile Pro Leu Val Val Pro Phe Tyr

1 5 10 15

Ser His Ser Ala Gln Pro Val Leu His Gln Pro Pro Ala Met Ser Ser

20 25 30

Ala Leu Gly Thr Thr Ile Arg Leu Thr Cys Thr Leu Arg Asn Asp His

35 40 45

Asp Ile Gly Val Tyr Ser Val Tyr Trp Tyr Gln Gln Arg Pro Gly His

50 55 60

Pro Pro Arg Phe Leu Leu Arg Tyr Phe Ser Gln Ser Asp Lys Ser Gln

65 70 75 80

Gly Pro Gln Val Pro Pro Arg Phe Ser Gly Ser Lys Asp Val Ala Arg

85 90 95

Asn Arg Gly Tyr Leu Ser Ile Ser Glu Leu Gln Pro Glu Asp Glu Ala

100 105 110
Met Tyr Tyr Cys Ala Met Gly Ala Arg Ser Ser Val Thr His Val Phe
115 120 125
Gly Ser Gly Thr Gln Leu Thr Val Leu Arg Gln Pro Lys Ala Ala Pro
130 135 140
Ser Val Thr Leu Phe Pro Pro Ser Ser Glu Glu Leu Gln Ala Asn Lys
145 150 155 160
Ala Thr Leu Val Cys Leu Ile Ser Asp Phe Tyr Pro Gly Ala Val Thr
165 170 175
Val Ala Trp Lys Ala Asp Gly Ser Pro Val Lys Ala Gly Val Glu Thr
180 185 190
Thr Thr Pro Ser Lys Gln Ser Asn Asn Lys Tyr Ala Ala Ser Ser Tyr
195 200 205
Leu Ser Leu Thr Pro Glu Gln Trp Lys Ser His Lys Ser Tyr Ser Cys
210 215 220
Gln Val Thr His Glu Gly Ser Thr Val Glu Lys Thr Val Ala Pro Thr
225 230 235 240
Glu Cys Ser Gly Ala Pro Val Pro Tyr Pro Asp Pro Leu Glu Pro Arg
245 250 255

<210> 14
<211> 269
<212> PRT
<213> Sequência artificial
<220>
<221> Fonte
<223> /observação="Descrição de Sequência artificial: Constructo sintético"
<400> 14
Met Lys Tyr Leu Leu Pro Thr Ala Ala Ala Gly Leu Leu Leu Leu Ala
1 5 10 15
Ala Gln Pro Ala Met Ala Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Gly Gly

20 25 30

Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly

35 40 45

Phe Pro Phe Ser Ser Tyr Val Met Ile Trp Val Arg Gln Val Pro Gly

50 55 60

Lys Gly Leu Glu Trp Val Ser Ala Ile Gly Gly Ser Gly Gly Ser Thr

65 70 75 80

Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn

85 90 95

Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Asp Asp

100 105 110

Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Val Leu Ser Pro Lys Ser Tyr Tyr Asp Asn

115 120 125

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

130 135 140

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

145 150 155 160

Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys

165 170 175

Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu

180 185 190

Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu

195 200 205

Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr

210 215 220

Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val

225 230 235 240

Asp Lys Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Ala Ala Ala His His His His

245 250 255

His His Gly Glu Gln Lys Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu

260 265

<210> 15

<211> 271

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

<221> Fonte

<223> /observação="Descrição de Sequência artificial: Constructo sintético"

<400> 15

Met Lys Tyr Leu Leu Pro Thr Ala Ala Ala Gly Leu Leu Leu Leu Ala
1 5 10 15

Ala Gln Pro Ala Met Ala Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Gly Gly
20 25 30

Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly
35 40 45

Phe Pro Phe Ser Ser Tyr Val Met Ile Trp Val Arg Gln Val Pro Gly
50 55 60

Lys Gly Leu Glu Trp Val Ser Ala Ile Gly Gly Ser Gly Gly Ser Thr
65 70 75 80

Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn
85 90 95

Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Asp Asp
100 105 110

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

Ser Gly Ile Tyr Phe Asp Phe Trp Gly Lys Gly Thr Leu Val Arg Val
130 135 140

Ser Ser Gly Ser Ala Ser Ala Pro Thr Leu Phe Pro Leu Val Ser Cys
145 150 155 160

Glu Asn Ser Pro Ser Asp Thr Ser Ser Val Ala Val Gly Cys Leu Ala
165 170 175

Gln Asp Phe Leu Pro Asp Ser Ile Thr Phe Ser Trp Lys Tyr Lys Asn
180 185 190

Asn Ser Asp Ile Ser Ser Thr Arg Gly Phe Pro Ser Val Leu Arg Gly
195 200 205
Gly Lys Tyr Ala Ala Thr Ser Gln Val Leu Leu Pro Ser Lys Asp Val
210 215 220
Met Gln Gly Thr Asp Glu His Val Val Cys Lys Val Gln His Pro Asn
225 230 235 240
Gly Asn Lys Glu Lys Asn Val Pro Leu Pro Val Ala Ala Ala His His
245 250 255
His His His His Gly Glu Gln Lys Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu
260 265 270

<210> 16
<211> 13
<212> PRT
<213> Sequência artificial
<220>
<221> Fonte
<223> /observação="Descrição de Sequência artificial: peptídeo sintético"
<400> 16
Gly Ala Pro Val Pro Tyr Pro Asp Pro Leu Glu Pro Arg
1 5 10

<210> 17
<211> 12
<212> PRT
<213> Sequência artificial
<220>
<221> Fonte
<223> /observação="Descrição de Sequência artificial: peptídeo sintético"
<400> 17
Gly Glu Gln Lys Leu Ile Ser Leu Glu Glu Asp Leu
1 5 10

<210> 18

<211> 159

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

<221> Fonte

<223> /observação="Descrição de Sequência artificial: Constructo sintético"

<400> 18

Val Lys Lys Leu Leu Leu Phe Ala Ile Pro Leu Val Val Pro Phe Tyr
1 5 10 15

Ser His Ser Ala Gln Pro Val Leu His Gln Pro Pro Ala Met Ser Ser
20 25 30

Ala Leu Gly Thr Thr Ile Arg Leu Thr Cys Thr Leu Arg Asn Asp His
35 40 45

Asp Ile Gly Val Tyr Ser Val Tyr Trp Tyr Gln Gln Arg Pro Gly His
50 55 60

Pro Pro Arg Phe Leu Leu Arg Tyr Phe Ser Gln Ser Asp Lys Ser Gln
65 70 75 80

Gly Pro Gln Val Pro Pro Arg Phe Ser Gly Ser Lys Asp Val Ala Arg
85 90 95

Asn Arg Gly Tyr Leu Ser Ile Ser Glu Leu Gln Pro Glu Asp Glu Ala
100 105 110

Met Tyr Tyr Cys Ala Met Gly Ala Arg Ser Ser Glu Lys Glu Glu Arg
115 120 125

Glu Arg Glu Trp Glu Glu Glu Met Glu Pro Thr Ala Ala Arg Thr Arg
130 135 140

Val Pro Gly Ala Pro Val Pro Tyr Pro Asp Pro Leu Glu Pro Arg
145 150 155

<210> 19

<211> 120

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

<221> Fonte

<223> /observação="Descrição de Sequência artificial: Constructo sintético"

<400> 19

Val Lys Lys Leu Leu Leu Phe Ala Ile Pro Leu Val Val Pro Phe Tyr
1 5 10 15

Ser His Ser Ala Gln Pro Val Leu His Gln Pro Pro Ala Met Ser Ser
20 25 30

Ala Leu Gly Thr Thr Ile Arg Leu Thr Cys Thr Leu Arg Asn Asp His
35 40 45

Asp Ile Gly Val Tyr Ser Val Tyr Trp Tyr Gln Gln Arg Pro Gly His
50 55 60

Pro Pro Arg Phe Leu Leu Arg Tyr Phe Ser Gln Ser Asp Lys Ser Gln
65 70 75 80

Gly Pro Gln Val Pro Pro Arg Phe Ser Gly Ser Lys Asp Val Ala Arg
85 90 95

Asn Arg Gly Tyr Leu Ser Ile Ser Glu Leu Gln Pro Glu Asp Glu Ala
100 105 110

Met Tyr Tyr Cys Ala Met Gly Ala
115 120

<210> 20

<211> 133

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

<221> Fonte

<223> /observação="Descrição de Sequência artificial: Constructo sintético"

<400> 20

Val Lys Lys Leu Leu Leu Phe Ala Ile Pro Leu Val Val Pro Phe Tyr

1 5 10 15
Ser His Ser Ala Gln Pro Val Leu His Gln Pro Pro Ala Met Ser Ser
20 25 30
Ala Leu Gly Thr Thr Ile Arg Leu Thr Cys Thr Leu Arg Asn Asp His
35 40 45
Asp Ile Gly Val Tyr Ser Val Tyr Trp Tyr Gln Gln Arg Pro Gly His
50 55 60
Pro Pro Arg Phe Leu Leu Arg Tyr Phe Ser Gln Ser Asp Lys Ser Gln
65 70 75 80
Gly Pro Gln Val Pro Pro Arg Phe Ser Gly Ser Lys Asp Val Ala Arg
85 90 95
Asn Arg Gly Tyr Leu Ser Ile Ser Glu Leu Gln Pro Glu Asp Glu Ala
100 105 110
Met Tyr Tyr Cys Ala Met Gly Ala Gly Ala Pro Val Pro Tyr Pro Asp
115 120 125
Pro Leu Glu Pro Arg
130

<210> 21
<211> 198
<212> PRT
<213> Sequência artificial
<220>
<221> Fonte
<223> /observação="Descrição de Sequência artificial: Constructo sintético"
<400> 21
Met Lys Lys Thr Ala Ile Ala Ile Ala Val Ala Leu Ala Gly Phe Ala
1 5 10 15
Thr Val Ala Gln Ala Ala Leu Leu Arg Pro Thr Ala Ala Ser Gln Ser
20 25 30
Arg Ala Leu Gly Pro Gly Ala Pro Gly Gly Ser Ser Arg Ser Ser Leu
35 40 45

Arg Ser Arg Trp Gly Arg Phe Leu Leu Gln Arg Gly Ser Trp Thr Gly
50 55 60
Pro Arg Cys Trp Pro Arg Gly Phe Gln Ser Lys His Asn Ser Val Thr
65 70 75 80
His Val Phe Gly Ser Gly Thr Gln Leu Thr Val Leu Ser Gln Pro Lys
85 90 95
Ala Thr Pro Ser Val Thr Leu Phe Pro Pro Ser Ser Glu Glu Leu Gln
100 105 110
Ala Asn Lys Ala Thr Leu Val Cys Leu Met Asn Asp Phe Tyr Pro Gly
115 120 125
Ile Leu Thr Val Thr Trp Lys Ala Asp Gly Thr Pro Ile Thr Gln Gly
130 135 140
Val Glu Met Thr Thr Pro Ser Lys Gln Ser Asn Asn Lys Tyr Ala Ala
145 150 155 160
Ser Ser Tyr Leu Ser Leu Thr Pro Glu Gln Trp Arg Ser Arg Arg Ser
165 170 175
Tyr Ser Cys Gln Val Met His Glu Gly Ser Thr Val Glu Lys Thr Val
180 185 190
Ala Pro Ala Glu Cys Ser
195

<210> 22
<211> 143
<212> PRT
<213> Sequência artificial
<220>
<221> Fonte
<223> /observação="Descrição de Sequência artificial: Constructo sintético"
<400> 22
Met Lys Lys Thr Ala Ile Ala Ile Ala Val Ala Leu Ala Gly Phe Ala
1 5 10 15
Thr Val Ala Gln Ala Ala Ser Val Thr His Val Phe Gly Ser Gly Thr

20 25 30

Gln Leu Thr Val Leu Ser Gln Pro Lys Ala Thr Pro Ser Val Thr Leu

35 40 45

Phe Pro Pro Ser Ser Glu Glu Leu Gln Ala Asn Lys Ala Thr Leu Val

50 55 60

Cys Leu Met Asn Asp Phe Tyr Pro Gly Ile Leu Thr Val Thr Trp Lys

65 70 75 80

Ala Asp Gly Thr Pro Ile Thr Gln Gly Val Glu Met Thr Thr Pro Ser

85 90 95

Lys Gln Ser Asn Asn Lys Tyr Ala Ala Ser Ser Tyr Leu Ser Leu Thr

100 105 110

Pro Glu Gln Trp Arg Ser Arg Arg Ser Tyr Ser Cys Gln Val Met His

115 120 125

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

130 135 140

<210> 23

<211> 175

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

<221> Fonte

<223> /observação="Descrição de Sequência artificial: Constructo sintético"

<400> 23

Met Ser Trp Ala Pro Val Leu Leu Met Leu Phe Val Tyr Cys Thr Gly

1 5 10 15

Cys Gly Pro Gln Pro Val Leu His Gln Pro Pro Ala Met Ser Ser Ala

20 25 30

Leu Gly Thr Thr Ile Arg Leu Thr Cys Thr Leu Arg Asn Asp His Asp

35 40 45

Ile Gly Val Tyr Ser Val Tyr Trp Tyr Gln Gln Arg Pro Gly His Pro

50 55 60

Pro Arg Phe Leu Leu Arg Tyr Phe Ser Gln Ser Asp Lys Ser Gln Gly
65 70 75 80
Pro Gln Val Pro Pro Arg Phe Ser Gly Ser Lys Asp Val Ala Arg Asn
85 90 95
Arg Gly Tyr Leu Ser Ile Ser Glu Leu Gln Pro Glu Asp Glu Ala Met
100 105 110
Tyr Tyr Cys Ala Met Gly Ala Arg Ser Ser Glu Lys Glu Glu Arg Glu
115 120 125
Arg Glu Trp Glu Glu Glu Met Glu Pro Thr Ala Ala Arg Thr Arg Val
130 135 140
Pro His Ala Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Val Ser Ser Tyr Leu Glu
145 150 155 160
Gly Gln Ala Ala Lys Glu Phe Ile Ala Trp Leu Val Lys Gly Arg
165 170 175
<210> 24
<211> 149
<212> PRT
<213> Sequência artificial
<220>
<221> Fonte
<223> /observação="Descrição de Sequência artificial: Constructo sintético"
<400> 24
Met Ser Trp Ala Pro Val Leu Leu Met Leu Phe Val Tyr Cys Thr Gly
1 5 10 15
Cys Gly Pro Gln Pro Val Leu His Gln Pro Pro Ala Met Ser Ser Ala
20 25 30
Leu Gly Thr Thr Ile Arg Leu Thr Cys Thr Leu Arg Asn Asp His Asp
35 40 45
Ile Gly Val Tyr Ser Val Tyr Trp Tyr Gln Gln Arg Pro Gly His Pro
50 55 60
Pro Arg Phe Leu Leu Arg Tyr Phe Ser Gln Ser Asp Lys Ser Gln Gly

65 70 75 80

Pro Gln Val Pro Pro Arg Phe Ser Gly Ser Lys Asp Val Ala Arg Asn

85 90 95

Arg Gly Tyr Leu Ser Ile Ser Glu Leu Gln Pro Glu Asp Glu Ala Met

100 105 110

Tyr Tyr Cys Ala Met Gly Ala His Ala Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp

115 120 125

Val Ser Ser Tyr Leu Glu Gly Gln Ala Ala Lys Glu Phe Ile Ala Trp

130 135 140

Leu Val Lys Gly Arg

145

<210> 25

<211> 243

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

<221> Fonte

<223> /observação="Descrição de Sequência artificial: Constructo sintético"

<400> 25

Met Arg Pro Gly Thr Gly Gln Gly Gly Leu Glu Ala Pro Gly Glu Pro

1 5 10 15

Gly Pro Asn Leu Arg Gln Arg Trp Pro Leu Leu Leu Leu His Ala Glu

20 25 30

Gly Thr Phe Thr Ser Asp Val Ser Ser Tyr Leu Glu Gly Gln Ala Ala

35 40 45

Lys Glu Phe Ile Ala Trp Leu Val Lys Gly Arg Gly Leu Ala Val Val

50 55 60

Thr His Gly Leu Leu Arg Pro Thr Ala Ala Ser Gln Ser Arg Ala Leu

65 70 75 80

Gly Pro Gly Ala Pro Gly Gly Ser Ser Arg Ser Ser Leu Arg Ser Arg

85 90 95

Trp Gly Arg Phe Leu Leu Gln Arg Gly Ser Trp Thr Gly Pro Arg Cys
100 105 110
Trp Pro Arg Gly Phe Gln Ser Lys His Asn Ser Val Thr His Val Phe
115 120 125
Gly Ser Gly Thr Gln Leu Thr Val Leu Ser Gln Pro Lys Ala Thr Pro
130 135 140
Ser Val Thr Leu Phe Pro Pro Ser Ser Glu Glu Leu Gln Ala Asn Lys
145 150 155 160
Ala Thr Leu Val Cys Leu Met Asn Asp Phe Tyr Pro Gly Ile Leu Thr
165 170 175
Val Thr Trp Lys Ala Asp Gly Thr Pro Ile Thr Gln Gly Val Glu Met
180 185 190
Thr Thr Pro Ser Lys Gln Ser Asn Asn Lys Tyr Ala Ala Ser Ser Tyr
195 200 205
Leu Ser Leu Thr Pro Glu Gln Trp Arg Ser Arg Arg Ser Tyr Ser Cys
210 215 220
Gln Val Met His Glu Gly Ser Thr Val Glu Lys Thr Val Ala Pro Ala
225 230 235 240
Glu Cys Ser

<210> 26
<211> 188
<212> PRT
<213> Sequência artificial
<220>
<221> Fonte
<223> /observação="Descrição de Sequência artificial: Constructo sintético"
<400> 26
Met Arg Pro Gly Thr Gly Gln Gly Gly Leu Glu Ala Pro Gly Glu Pro
1 5 10 15
Gly Pro Asn Leu Arg Gln Arg Trp Pro Leu Leu Leu Leu Gly His Ala

20 25 30

Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Val Ser Ser Tyr Leu Glu Gly Gln Ala

35 40 45

Ala Lys Glu Phe Ile Ala Trp Leu Val Lys Gly Arg Leu Ala Val Val

50 55 60

Thr His Gly Ser Val Thr His Val Phe Gly Ser Gly Thr Gln Leu Thr

65 70 75 80

Val Leu Ser Gln Pro Lys Ala Thr Pro Ser Val Thr Leu Phe Pro Pro

85 90 95

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

100 105 110

Asn Asp Phe Tyr Pro Gly Ile Leu Thr Val Thr Trp Lys Ala Asp Gly

115 120 125

Thr Pro Ile Thr Gln Gly Val Glu Met Thr Thr Pro Ser Lys Gln Ser

130 135 140

Asn Asn Lys Tyr Ala Ala Ser Ser Tyr Leu Ser Leu Thr Pro Glu Gln

145 150 155 160

Trp Arg Ser Arg Arg Ser Tyr Ser Cys Gln Val Met His Glu Gly Ser

165 170 175

Thr Val Glu Lys Thr Val Ala Pro Ala Glu Cys Ser

180 185

<210> 27

<211> 105

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 27

Gly Ser Gln Ser Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Ala Ala Pro

1 5 10 15

Gly Gln Lys Val Thr Ile Ser Cys Ser Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly

20 25 30

Asn Asn Tyr Val Ser Trp Tyr Gln Gln Leu Pro Gly Thr Ala Pro Lys

35 40 45

Leu Leu Ile Tyr Asp Asn Asn Lys Arg Pro Ser Gly Ile Pro Asp Arg
50 55 60
Phe Ser Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Thr Leu Gly Ile Thr Gly
65 70 75 80
Leu Gln Thr Gly Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gly Thr Trp Asp Ser
85 90 95
Ser Leu Ser Ala Val Val Phe Gly Gly
100 105

<210> 28
<211> 114
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 28
Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Arg Gln Pro Lys Ala Ala Pro Ser
1 5 10 15
Val Thr Leu Phe Pro Pro Ser Ser Glu Glu Leu Gln Ala Asn Lys Ala
20 25 30
Thr Leu Val Cys Leu Ile Ser Asp Phe Tyr Pro Gly Ala Val Thr Val
35 40 45
Ala Trp Lys Ala Asp Gly Ser Pro Val Lys Ala Gly Val Glu Thr Thr
50 55 60
Thr Pro Ser Lys Gln Ser Asn Asn Lys Tyr Ala Ala Ser Ser Tyr Leu
65 70 75 80
Ser Leu Thr Pro Glu Gln Trp Lys Ser His Lys Ser Tyr Ser Cys Gln
85 90 95
Val Thr His Glu Gly Ser Thr Val Glu Lys Thr Val Ala Pro Thr Glu
100 105 110
Cys Ser

<210> 29
<211> 105
<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 29

Gln Pro Val Leu Thr Gln Pro Ser Ser His Ser Ala Ser Ser Gly Ala
1 5 10 15

Ser Val Arg Leu Thr Cys Met Leu Ser Ser Gly Phe Ser Val Gly Asp
20 25 30

Phe Trp Ile Arg Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Asn Pro Pro Arg Tyr
35 40 45

Leu Leu Tyr Tyr His Ser Asp Ser Asn Lys Gly Gln Gly Ser Gly Val
50 55 60

Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Asn Asp Ala Ser Ala Asn Ala Gly Ile
65 70 75 80

Leu Arg Ile Ser Gly Leu Gln Pro Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys
85 90 95

Gly Thr Trp His Ser Asn Ser Lys Thr
100 105

<210> 30

<211> 104

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 30

Gln Ala Val Leu Thr Gln Pro Ala Ser Leu Ser Ala Ser Pro Gly Ala
1 5 10 15

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

Tyr Arg Ile Tyr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Ser Pro Pro Gln Tyr
35 40 45

Leu Leu Arg Tyr Lys Ser Asp Ser Asp Lys Gln Gln Gly Ser Gly Val
50 55 60

Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Lys Asp Ala Ser Ala Asn Ala Gly Ile
65 70 75 80

Leu Leu Ile Ser Gly Leu Gln Ser Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys

85 90 95

Met Ile Trp His Ser Ser Ala Ser

100

<210> 31

<211> 104

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 31

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

1 5 10 15

Ser Ala Arg Leu Thr Cys Thr Leu Pro Ser Asp Ile Asn Val Gly Ser

20 25 30

Tyr Asn Ile Tyr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Ser Pro Pro Arg Tyr

35 40 45

Leu Leu Tyr Tyr Tyr Ser Asp Ser Asp Lys Gly Gln Gly Ser Gly Val

50 55 60

Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Lys Asp Ala Ser Ala Asn Thr Gly Ile

65 70 75 80

Leu Leu Ile Ser Gly Leu Gln Ser Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys

85 90 95

Met Ile Trp Pro Ser Asn Ala Ser

100

<210> 32

<211> 113

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 32

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

1 5 10 15

Thr Leu Phe Pro Pro Ser Ser Glu Glu Leu Gln Ala Asn Lys Ala Thr

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

Pro Ser Lys Gln Ser Asn Asn Lys Tyr Ala Ala Ser Ser Tyr Leu Ser

65 70 75 80

Leu Thr Pro Glu Gln Trp Lys Ser His Lys Ser Tyr Ser Cys Gln Val

85 90 95

Thr His Glu Gly Ser Thr Val Glu Lys Thr Val Ala Pro Thr Glu Cys

100 105 110

Ser

<210> 33

<211> 107

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 33

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

1 5 10 15

Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe

20 25 30

Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln

35 40 45

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

50 55 60

Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu

65 70 75 80

Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser

85 90 95

Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys

100 105

<210> 34

<211> 6

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

<221> Fonte

<223> /observação="Descrição de Sequência artificial: sintético 6xHis tag"

<400> 34

His His His His His His

1 5

<210> 35

<211> 15

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

<221> Fonte

<223> /observação="Descrição de Sequência artificial: peptídeo sintético"

<400> 35

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser

1 5 10 15